

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



Nuevas proteínas de unión a RNA: efecto en la traducción dependiente de IRES

JAVIER FERNÁNDEZ CHAMORRO

MADRID, Junio 2017

MEMORIA PRESENTADA POR
JAVIER FERNÁNDEZ CHAMORRO,
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA,
PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN
BIOCIENCIAS MOLECULARES

DIRECTORA DE LA TESIS:
Dra ENCARNACIÓN MARTÍNEZ-SALAS

Este trabajo ha sido realizado en el
Departamento de Biología Molecular.
Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa'
(CSIC-UAM)

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM) bajo la dirección de la doctora Encarnación Martínez-Salas, Profesora de Investigación del CSIC.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a una beca de Formación de Personal Investigador concedida a Javier Fernández Chamorro por el Ministerio de Economía.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	13
RESUMEN	19
INTRODUCCIÓN	25
1. <i>Traducción en células eucariotas</i>	27
1.1. Inicio de la traducción dependiente de cap	27
1.2. Inicio de la traducción dependiente de IRES	30
2. <i>Elemento IRES de Picornavirus</i>	31
2.1. IRES del virus de la fiebre aftosa	31
3. <i>RBP<i>s</i> implicadas en la traducción IRES-dependiente</i>	33
3.1. Gemin5	36
4. <i>Picornavirus</i>	38
5. <i>Transporte de proteínas a través de rutas secretoras</i>	40
OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. <i>Construcciones</i>	51
2. <i>Bacterias</i>	53
3. <i>Purificación de proteínas</i>	54
4. <i>Interacción RNA-proteína</i>	54
5. <i>Traducción in vitro</i>	55
6. <i>Líneas celulares y medios de cultivo</i>	56
7. <i>Inmunodetección</i>	58
8. <i>Preparación de extractos celulares S10</i>	58
9. <i>Extracción de RNA de células</i>	58

<i>10. Identificación de proteínas que interaccionan con subdominios estructurales del IRES</i>	58
<i>11. Marcaje de células con isótopos estables de aminoácidos</i>	59
<i>12. Espectrometría de masas</i>	60
<i>13. Análisis informáticos de las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas</i>	62

RESULTADOS

<i>1. Sitios de unión a RNA no canónicos en Gemin5 implicados en la iniciación interna de la traducción</i>	67
1.1. La interacción de Gemin5 con el IRES implica un sitio bipartito localizado en la región C-terminal	67
1.2. Deleciones en la zona N-terminal de RBS1 disminuyen su capacidad de unión	69
1.3. La expresión de formas truncadas de Gemin5 en células de mamífero revela diferencias en la proteína acumulada	71
1.4. El dominio RBS2 de Gemin5 se comporta como un represor de la traducción	72
1.5. Relación entre la capacidad de Gemin5 de modular la traducción y los productos de proteólisis en células infectadas	76
<i>2. Nuevas proteínas de interacción con el dominio 3 del IRES de FMDV</i>	79
2.1. Purificación de RNAs quimera que contienen los subdominios del dominio 3	79
2.2. Aislamiento y purificación de proteínas asociadas al dominio 3	80
2.3. Las proteínas identificadas con el dominio 3 están implicadas en la localización del RNA, además de la traducción	83
2.4. Proteínas diferenciales de los subdominios estructurales del dominio 3	86
2.5. El dominio 3 del IRES de FMDV está implicado en la interacción con el ribosoma	89
2.6. Nuevas proteínas de unión a RNA	90
2.7. RBPs como nuevos factores asociados al dominio 3	94

<i>3. Proteínas asociadas diferencialmente al IRES de FMDV in vivo</i>	99
3.1. Purificación de proteínas asociadas al IRES de FMDV	101
3.2. Identificación de proteínas asociadas diferencialmente al IRES de FMDV	102
3.3. UPF1, una proteína de unión a RNA promiscua que interacciona con el IRES de FMDV	105
DISCUSIÓN	109
<i>1. Gemin5: una proteína multifuncional implicada en la biogénesis de snRNPs y en el control de la traducción</i>	111
<i>2. Los dominios estructurales del IRES son reconocidos diferencialmente por factores celulares implicados en diversas funciones</i>	114
<i>3. Factores específicamente asociados a RNAs portadores del elemento IRES funcional en células en cultivo</i>	120
<i>4. Importancia del IRES en la multiplicación viral</i>	124
CONCLUSIONES	127
BIBLIOGRAFÍA	131

ABREVIATURAS

ARF	Del inglés ADP ribosylation factor, factor de ribosilación de ADP
AUGi	AUG iniciador
Caprin1	Del inglés cytoplasmic activation- and aroliferation-associated protein 1, proteína citoplasmática asociada a la activación de la proliferación
CAT	Cloranfenicol-acetil transferasa
CC	Del inglés coiled-coil, ovillo enrollado
Celf1	Del inglés CUGBP Elav-Like family member 1, proteína 1 de la familia tipo CUGBP-Elav
DENV	Virus del Dengue
DMEM	Del inglés Dulbecco médium modified by Eable, medio Dulbecco modificado por Eagle
dsRBD	Del inglés double stranded RNA binding domain, dominio de unión a RNA de doble banda
Ebp1	Del inglés ErbB3-Binding Protein 1, proteína de unión a erB-3
eIFs	Factores de iniciación eucariota
EMCV	Virus de la encefalomiocarditis
ER	Retículo endoplásmico
eRFs	Factores de liberación eucariota
FAS	Del inglés Fatty acid synthase, sintasa de ácidos grasos
FDR	Del inglés False Discovery rate, proporción de falsos positivos
FMDV	Del inglés foot-and-mouth disease virus, virus de la fiebre aftosa
GBF1	Del inglés Golgi brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1, factor de intercambio de nucleótidos de guanina del Golgi para la resistencia a brefeldina A
GEF	Del inglés guanine nucleotide exchange factor, proteína intercambiadora de guanina
GFP	Del inglés green fluorescent protein, proteína verde fluorescente
GO	Gene Ontology
HCV	Virus de la hepatitis C
hnRNP	Del inglés, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, ribonucleoproteína heterogénea nuclear
IRES	Del inglés internal ribosome entry site, sitio de entrada interna del ribosoma
ITAF	Del inglés IRES trans acting factor, factor transactivador del IRES

ABREVIATURAS

iTRAQ	Del inglés Isobaric tags for relative and absolute quantitation, marcaje isobárico para la cuantificación relativa y absoluta
Lb	Proteasa Lb de FMDV
Luc	Luciferasa
MAP	Del inglés mix after purification, mezclar después de purificar
NMR	Del inglés nuclear magnetic resonance, resonancia magnética nuclear
NONO	Del inglés Non-POU domain containing, octamer-Binding, proteína de unión a octámeros que contienen el dominio Non-POU
NTR	Del inglés Non-translated regions, regiones no traducidas
ORF	Del inglés open reading frame, región codificante
PABP	Del inglés poly(A) binding protein, proteína de unión a colas de poli(A)
PANTHER	Del inglés Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships
PCBP	Del inglés poly(rC) binding protein, proteína de unión a poli(rC)
PCR	Del inglés polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa
PIC	Del inglés pre-initiation complex, complejo de preiniciación
PTB	De inglés polypyrimidine tract binding protein, proteína de unión a tramos de polipirimidinas
PV	Virus de la polio
Rack1	Del inglés Receptor For Activated C Kinase 1, receptor de la quinasa C activada
RBP	Del inglés RNA binding protein, proteína de unión a RNA
RGG	Motivo repetido Arg-Gly-Gly
RO	Del inglés replication organelles, orgánulos de replicación
RRL	Del inglés rabbit reticulocyte lysate, lisado de reticulocitos de conejo
RRM	Del inglés RNA recognition motif, motivo de reconocimiento de RNA
SDS-PAGE	Del inglés, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato sódico
SG	Del inglés stress granules, gránulos de estrés
SILAC	Del inglés Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture, marcaje con isótopos estables de aminoácidos en células en cultivo
siRNA	Del inglés small interfering RNA, RNAs pequeños de interferencia

Sm	Proteína seven members
snRNA	Del inglés small nuclear RNA, RNAs pequeños nucleares
snRNP	Del inglés small nuclear ribonucleoprotein, ribonucleoproteínas pequeñas nucleares
STAU	Staufen
UIP	Del inglés intrinsically disordered protein, proteína intrínsecamente desestructurada
UPF1	Del inglés Regulator Of Nonsense Transcripts 1, factor de regulación del mRNA sin-sentido
UV	Ultravioleta
WB	Western-Blot



RESUMEN

La síntesis de proteínas es un proceso fuertemente regulado. Los picornavirus han desarrollado estrategias para sortear la inhibición de la traducción que ocurre durante la infección. Una de estas estrategias reside en el elemento de entrada interna del ribosoma (IRES), que recluta la maquinaria de traducción sobre el codón de iniciación. Los elementos IRES son regiones de RNA modulares. El IRES del virus de la fiebre aftosa (FMDV) contiene 5 dominios, responsables de la interacción en trans con proteínas de unión a RNA (RBPs) y factores de iniciación (eIFs), entre los que se encuentran PTB, PCBP2, Ebp1 o Gemin5.

Gemin5 es una RBP citosólica implicada en la síntesis de la maquinaria de splicing. Es la proteína responsable de reconocer los RNAs pequeños nucleares (snRNAs). Gemin5 interacciona con resinas de m⁷GTP, con eIF4E, y con el IRES del virus de la hepatitis C (HCV) y el IRES de FMDV. La asociación con el IRES tiene lugar a través de una región distinta a la que reconoce los snRNAs, además, reprime la actividad IRES y se proteoliza durante la infección por FMDV. Gemin5 posee en su región C-terminal un sitio de unión a RNA bipartito, denominado RBS1 y RBS2. La transfección de fragmentos de Gemin5 en células silenciadas reveló que el dominio RBS2 es el responsable de reprimir la actividad IRES.

El dominio 3 del IRES adopta una estructura cruciforme con varios subdominios, que determinan su estructura tridimensional, además se han descrito pocas proteínas que reconozcan este dominio. Mediante RNAs quimera que contienen aptámeros de estreptavidina hemos purificado proteínas asociadas a los subdominios del dominio 3 que contienen motivos esenciales para su actividad. La identificación de las proteínas purificadas mediante espectrometría de masas y su posterior validación mediante ensayos de interacción RNA-proteína, reveló que el dominio 3 interacciona con numerosas proteínas, como SYNCRIP, Celf1, NONO, Caprin1, RPS25 o Rack1, además de proteínas implicadas en el transporte celular, como ARF5 o Rab1b. El análisis de las proteínas diferencialmente unidas al IRES en el contexto de un RNA funcional mediante marcaje isotópico con aminoácidos pesados en células en cultivo (SILAC) indicó que el IRES tiene mayor afinidad por el ribosoma que un mRNA que no lo contiene. Además, varias de las proteínas identificadas coinciden con las observadas en el dominio 3, entre otras UPF1, una proteína implicada en el control de calidad del mRNA. UPF1 es una RBP promiscua, cuyo efecto sobre la traducción mediada por IRES podría basarse en la estabilidad del RNA.

Los datos obtenidos en esta Tesis doctoral describen las regiones de Gemin5 implicadas en la interacción con el IRES y en la regulación de su actividad. Además, sugieren que el IRES puede estar implicado en otras etapas del ciclo viral, como el transporte del genoma viral al retículo para su traducción o a los orgánulos de replicación para su encapsidación.

Protein synthesis is a highly regulated process. Picornaviruses have developed strategies to circumvent the inhibition of translation that occurs during infection. One of these strategies resides in the internal ribosome entry element (IRES), which recruits translation machinery on the initiation codon. IRES elements are regions of modular RNA. The Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) IRES contains 5 domains, responsible for the interaction in trans with RNA-binding proteins (RBPs) and initiation factors (eIFs), among which are PTB, PCBP2, Ebp1 or Gemin5.

Gemin5 is a cytosolic RBP involved in the synthesis of splicing machinery. Gemin5 is responsible for recognizing small nuclear RNAs (snRNAs). Gemin5 interacts with m7GTP resins, eIF4E and with the hepatitis C virus (HCV) IRES as well as FMDV IRES. Gemin5 associates with IRES through a different region than that recognized snRNAs also represses IRES activity and is proteolyzed during FMDV infection. Gemin5 possesses in its C-terminal region a bipartite RNA binding site, called RBS1 and RBS2. Transfection of Gemin5 fragments into silenced cells revealed that the RBS2 domain is responsible for repressing IRES activity.

The domain 3 of the IRES adopts a cruciform structure with several subdomains, which determine its three-dimensional structure. Few proteins have been described that recognize this domain. By chimeric RNAs harbouring streptavidin aptamers we have purified proteins associated with subdomains of domain 3 that contain motifs essential for their activity. The identification of purified proteins by mass spectrometry and their subsequent validation by RNA-protein interaction assays revealed that domain 3 interacts with several proteins such as SYNCRIP, Celf1, NONO, Caprin1, RPS25 or Rack1, in addition to proteins involved in cellular transport, such as ARF5 or Rab1b. Analysis of the differentially bound proteins to the IRES in the context of a functional RNA by isotopic labelling with heavy amino acids in cultured cells (SILAC) indicated that IRES has higher affinity for the ribosome than an mRNA that does not contain it. In addition, several of the proteins identified coincided with those observed in domain 3, among others UPF1, a protein involved in Nonsense-mediated mRNA decay. UPF1 is a promiscuous RBP whose effect on IRES-mediated translation could be based on RNA stability.

The data obtained in this PhD thesis describe the regions of Gemin5 involved in the interaction with the IRES and in the regulation of its activity. Moreover, they suggest that IRES may be involved in other stages of the viral cycle, such as the transport of the viral genome to the reticulum for translation or to the replication organelles for encapsidation.



INTRODUCCIÓN

1. Traducción en células eucariotas

La traducción es un paso esencial en el flujo de información genética que permite a las células expresar proteínas. El primer paso de este flujo es la transcripción, que transforma la información genética almacenada en forma de DNA en RNA en el núcleo de las células (tRNAs, rRNAs, mRNAs, miRNAs, lncRNAs, snRNAs, snoRNAs...). El RNA mensajero (mRNA) sufre una serie de modificaciones en el núcleo, como son: adición en el extremo 5' de la estructura cap (metil-7-G(pppN)), de la cola de poli(A) en el extremo 3', así como el proceso de splicing, por el que se eliminan de la secuencia los intrones y se empalman los exones, dando lugar al mRNA maduro que se exporta al citoplasma. El mRNA está formado por la región codificante (ORF), que se inicia mayoritariamente en un triplete AUG, y está flanqueada por dos regiones no traducidas (NTR), donde se concentran elementos que regulan su traducción (Wilkie et al., 2003).

Una vez el mRNA es transportado al citoplasma tiene lugar el proceso de traducción, mediante el cual la secuencia de nucleótidos de su ORF es decodificada por el ribosoma dando lugar a la proteína que codifica. En la célula existen dos poblaciones ribosomales, una de ribosomas libres y otra de ribosomas asociados al retículo endoplásmico (ER). Inicialmente se determinó que los ribosomas se asociaban temporalmente al ER para la síntesis de proteínas secretoras o de membrana (Palade, 1975). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que los ribosomas son capaces de unir la membrana del ER por sí mismos, pero también a través de diversos factores, para la síntesis de proteínas secretoras, de membrana o citosólicas (Jagannathan et al., 2014; Reid and Nicchitta, 2015).

1.1. Inicio de la traducción dependiente de cap

La traducción ocurre en cuatro etapas: iniciación, elongación, terminación y reciclaje del ribosoma, siendo la más regulada la etapa de iniciación (Sonenberg and Hinnebusch, 2009). La etapa de iniciación consiste, a su vez, en distintos pasos que incluyen el ensamblaje de la subunidad menor del ribosoma (40S) sobre el codón AUG de inicio y el posterior reclutamiento de la subunidad mayor (60S) (Fig.1). En este proceso intervienen factores de iniciación (eIFs), junto con RNAs de transferencia (tRNA) (Jackson et al., 2010). En organismos eucariotas, esta etapa se divide en cuatro pasos: disociación del ribosoma en sus subunidades 40S y 60S, formación del complejo de preiniciación (PIC) 43S, ensamblaje del complejo 48S y unión de la subunidad 60S (Hinnebusch, 2014).

a) Disociación del ribosoma en las subunidades 40S y 60S: La traducción es un proceso cíclico en el que se dispone de un remanente de ribosomas que son reutilizados. Los ribosomas están asociados a mRNA, factores de liberación (eRF) 1 y 3 y un tRNA acetilado en su sitio P. Los factores de iniciación eIF1 y eIF1A van a favorecer la disociación de las subunidades 60S y 40S, junto con eIF3, un complejo multifunción formando por 13 polipéptidos (denominados eIF3a-m) en eucariotas superiores (Cate, 2017).

INTRODUCCIÓN

Además, eIF1 libera el tRNA y eIF3j estimula la liberación del mRNA (Pisarev et al., 2007; Sun et al., 2011). En ensayos de reconstitución del ribosoma en presencia de altas concentraciones de magnesio, que estabilizan las interacciones entre las subunidades ribosomales, se determinó que son necesarias las proteínas de la familia de las ATP-binding cassette (ABC) para la disociación del ribosoma 80S en sus subunidades (Pisarev et al., 2010).

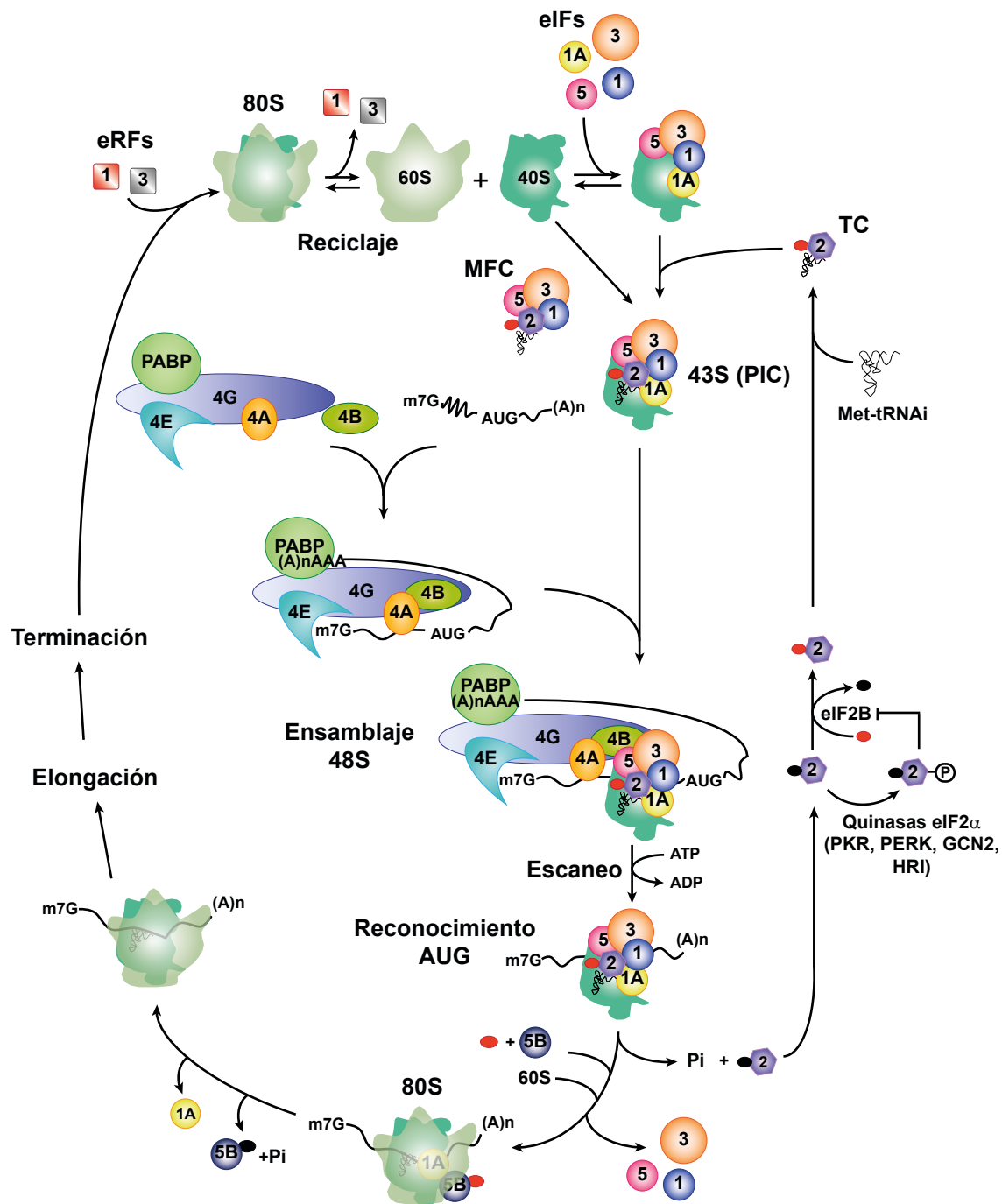


Figura 1. Representación esquemática del inicio de la traducción dependiente de cap. El factor de iniciación eIF4F reconoce el mRNA a través de la estructura cap (m7G). La subunidad ribosomal 40S se asocia con varios eIFs para formar el complejo 43S. El complejo 48S escanea la región 5'UTR del mRNA hasta encontrar el triplete iniciador AUG. En ese paso se asocia la subunidad ribosomal 60S, comenzando la fase de elongación. Ver detalles en el texto. Adaptado de Sonenberg et al 2009.

b) Formación del PIC 43S: En este paso la subunidad 40S permanece unida a eIF1, eIF1A, eIF3 y eIF5 (Fig.1). La unión de eIF1 y eIF1A a la subunidad menor del ribosoma provoca un cambio estructural que abre el canal de entrada ((Passmore et al., 2007), donde se localizará más adelante el mRNA. eIF3 tiene la capacidad de unirse al complejo ternario (TC), formado por eIF2 unido a GTP y Met-tRNA_i, así como a eIF1, eIF1A y eIF5, aún en ausencia de la subunidad 40S, formando el complejo multifunción (MFC) (Asano et al., 2000; Kolupaeva et al., 2005). Por lo tanto, para la formación del PIC (formado por 40S, eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5 y TC) es fundamental eIF3.

El ensamblaje del PIC está regulado por la disponibilidad de eIF2 unido a GTP, ya que la fosforilación del mismo provoca que eIF2B no intercambie el GDP resultante de la hidrólisis mediada por eIF5B (Lorsch and Dever, 2010), disminuyendo la disponibilidad de TC, y por ello la traducción. La fosforilación de eIF2 es llevada a cabo por cuatro quinasas en respuesta a distintos estímulos: HRI (en respuesta a niveles de hemina), PKR (en respuesta a RNAs de doble banda, normalmente virales), PERK (en respuesta a estrés de retículo) y Gcn2 (que se activa debido a la ausencia de aminoácidos) (Ron, 2007) (Fig.1).

c) Ensamblaje del complejo 48S: Esta etapa consiste en la unión del PIC al mRNA a través del residuo m⁷GTP (denominado cap) presente en el extremo 5'. El reconocimiento del cap lo lleva a cabo el complejo eIF4F, compuesto por eIF4E (una proteína con capacidad de unir el cap), eIF4A (una helicasa de RNA) y eIF4G (una proteína de andamiaje) (Fig.1). eIF4G es capaz de unir, además de eIF4E y eIF4A, a la proteína de unión a colas de poli(A) (PABP) y a eIF3. Por lo tanto, es responsable de la formación del complejo 48S y de la pseudo-circularización del mRNA, facilitando rondas sucesivas de traducción (Pestova and Hellen, 2000). Una vez tiene lugar el ensamblaje del PIC sobre el mRNA ocurre el escaneo del mRNA hasta localizar un triplete AUG en un contexto óptimo (Hinnebusch, 2014).

eIF4A es una helicasa de RNA dependiente de ATP que desenrolla el mRNA permitiendo el movimiento de la subunidad 40S. Para su actividad es necesario eIF4G y eIF4B. La interacción con eIF4G y eIF4B permite que adopte una conformación abierta y orientada sobre el mRNA para iniciar el desenrollamiento (Schutz et al., 2008). En aquellos mRNAs cuya región 5' adopta una estructura muy estable, la actividad helicasa de eIF4A no es suficiente y se requiere de la actividad de otras helicasas, como DHX29 (Pisareva et al., 2008).

El reconocimiento del codón de inicio suele tener lugar sobre el primer triplete AUG que esté a más de 8 nucleótidos del cap en un contexto óptimo, GCC(A/G) CCAAUGG, caracterizado por la presencia de una purina en posición -3 y una G en +4 (relativos a la A del AUG) (Kozak, 1989). En este proceso tienen un papel clave eIF1 y eIF1A (Pestova et al., 1998), ya que son los responsables de mantener la conformación abierta de la subunidad 40S hasta que se produce el emparejamiento codón-anticodón. Este proceso provoca el desplazamiento de eIF1 mediado por la región N-terminal de eIF1A e induce un cambio conformacional que cierra la subunidad ribosomal sobre el mRNA (Fringer et al., 2007).

Una vez se ha producido el emparejamiento codón-anticodón, eIF5 desencadena la hidrólisis del GTP unido a eIF2, dando lugar a la liberación de eIF2, junto con eIF1, eIF3 y el propio eIF5 (Pestova and Kolupaeva, 2002).

d) **Ensamblaje del complejo 80S:** La unión de la subunidad 60S está mediada por la hidrólisis del GTP unido a eIF5B (Pestova et al., 2000), que va ser reclutado al complejo 48S ensamblado sobre el codón AUG por eIF1A (Acker et al., 2006; Shin et al., 2002) (Fig.1). La formación del complejo 80S provoca la liberación de eIF1A, la única proteína presente durante toda la etapa de iniciación. Tras la formación del complejo 80S se inicia la etapa de elongación.

1.2. Inicio de la traducción dependiente de IRES

Aunque la mayoría de los mRNAs inician su traducción a partir del reconocimiento del cap, algunos se traducen a través de sitios de entrada interna del ribosoma (IRES). Estos sitios son regiones de RNA generalmente localizados en la zona 5'-NTR, que se describieron por primera vez en el genoma del virus de la polio (PV) y el de la encefalomiocarditis (EMCV) (Jang et al., 1988; Pelletier and Sonenberg, 1988). Los IRES permiten la interacción entre la subunidad 40S y el RNA viral independientemente de la estructura cap y de eIF4E. Esto confiere a los RNAs virales la posibilidad de traducir su genoma en condiciones en las cuales la traducción cap-dependiente está inhibida (Walsh and Mohr, 2011).

Con el tiempo se han descrito nuevos elementos IRES en otras familias de virus. Sin embargo, no existe conservación de estructura primaria o secundaria entre ellos. Los elementos IRES se han clasificado atendiendo a los factores que necesitan para su traducción (Fig.2) (Martinez-Salas et al., 2015). Los IRES de picornavirus de los tipos I y II (como enterovirus o aftovirus), no necesitan eIF4E ni la región N-terminal de eIF4G (responsable de unir eIF4E). Los IRES de los hepacivirus, como el virus de la hepatitis C (HCV), son capaces de iniciar la traducción solamente con eIF3 y el TC (Pestova et al., 1998). Los IRES de los dicistrovirus, como el virus de la parálisis del grillo (CrPV) (que contiene un genoma con dos cistrones separados por una región intergénica (IGR)) que pliega en forma de tres pseudonudos (PKs); PK1 mimetiza al tRNA_i y facilita el ensamblaje de la subunidad 40S del ribosoma sobre el RNA sin necesidad de ningún eIF (Pfungsten et al., 2006; Schuler et al., 2006).

La traducción dirigida por elementos IRES está mediada, además de por la disponibilidad de eIFs, por proteínas que actúan en *trans* (ITAFs). Los ITAFs son, normalmente, proteínas de unión a RNA (RBPs). Entre ellos se encuentran, la proteína de unión a tramos de polipirimidinas (PTB), proteínas de unión a poli(C) (PCBP 1-2), ribonucleoproteínas nucleares (hnRNPC1, hnRNPD), la proteína de unión a erbB-3 (Ebp1, ITAF45 o PA2G4), el autoantígeno del Lupus (La), o Gemin5, entre otras (Fitzgerald and Semler, 2009; Pacheco and Martinez-Salas, 2010).

Se han descrito diversos mRNAs celulares que poseen un elemento IRES, como myc (Stoneley et al., 1998) o lef1 (Jimenez et al., 2005), que permiten la traducción de las proteínas que codifican en condiciones en las que la traducción dependiente de cap está inhibida, por ejemplo en respuesta al estrés de retículo, la falta de nutrientes o la apoptosis (Qin and Sarnow, 2004).

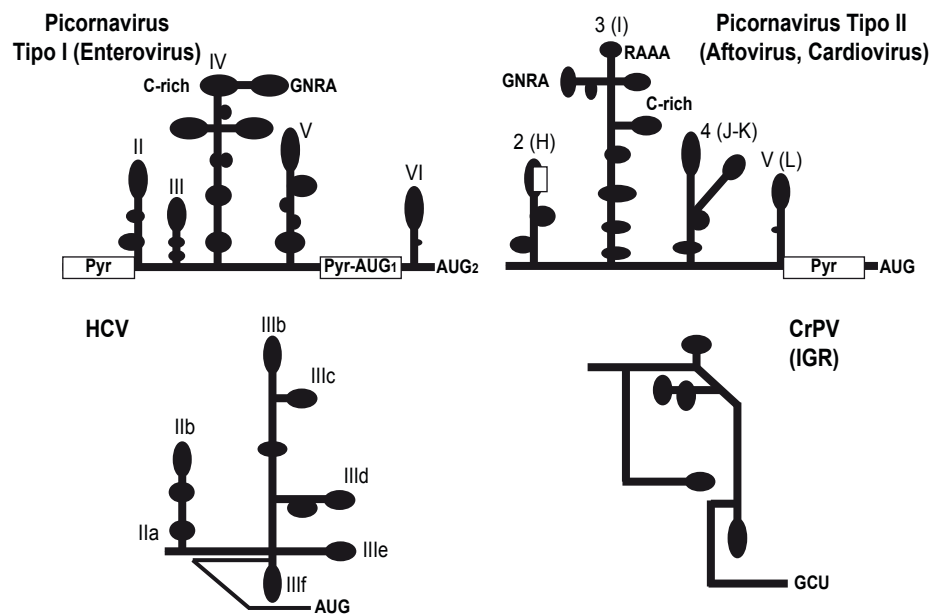


Figura 2. Tipos de IRES virales. Representación esquemática de la estructura de los IRES de picornavirus (tipo I y II), el IRES de HCV y la región intergénica (IGR) de dicistrovirus, representada por CrPV. Se indican los dominios, los motivos conservados, y la posición del triplete iniciador. Las cajas blancas representan los tramos ricos en pirimidinas (Pyr).

2. Elemento IRES de Picornavirus

El genoma de los picornavirus consta de una molécula de RNA de orientación positiva, que contiene NTRs esenciales para la multiplicación viral. Todos los picornavirus tienen en común la presencia en su genoma del elemento IRES en el extremo 5'-NTR. Los elementos IRES comparten una organización modular en dominios con distintas funciones; todos los dominios del elemento IRES son necesarios, pero no suficientes para iniciar la traducción.

Atendiendo a la estructura secundaria, los IRES de picornavirus se pueden clasificar en cinco tipos. Los enterovirus (PV o el rinovirus humano, RH), se engloban dentro del tipo I; el tipo II incluye a los cardiovirus (EMCV) y a los aftovirus (el virus de la fiebre aftosa (FMDV)) (Fig.2). Los IRES de los tipos I y II necesitan los mismos eIFs: eIF4A, eIF1, eIF3 y el extremo C-terminal de eIF4G. El IRES de la hepatitis A representa al grupo III y necesitan el factor eIF4G intacto para sintetizar la poliproteína viral. Los IRES HCV-like pertenecen al tipo IV; se caracterizan por iniciar la traducción en ausencia de eIF4G. Por último, los IRES de los virus tipo aichivirus (AV-like) forman el tipo V y para su actividad es esencial la helicasa RNA DHX29, además de los factores eIF4G, eIF4A, eIF4B, eIF1, eIF1A y eIF2 (Martínez-Salas et al., 2015).

2.1. IRES del virus de la fiebre aftosa

Dentro de los miembros de la familia de los picornavirus, nuestro laboratorio se ha centrado en FMDV, que infecta animales de granja provocando grandes pérdidas económicas (Sobrino and Domingo, 2001). En el extremo 5' de su genoma posee una estructura en forma

INTRODUCCIÓN

de horquilla denominada S (Lawrence and Rieder, 2009), seguido de una región de unas 200 bases rico en citosinas. A continuación existen tres motivos estructurales distintos: de dos a cuatro pseudoknots (Clarke et al., 1987), el elemento de activador de la replicación en *cis* (*cre*) (Mason et al., 2002) y el elemento IRES (Fig.3A). El genoma de FMDV contiene dos codones AUG iniciadores (AUG1 y AUG2) (Clarke et al., 1985), siendo el AUG2 el usado con más frecuencia para iniciar la síntesis de proteínas (Lopez de Quinto and Martinez-Salas, 1999). El mecanismo de iniciación en AUG2 depende de eIF1 y se estimula por PTB y Ebp1 (Andreev et al., 2007).

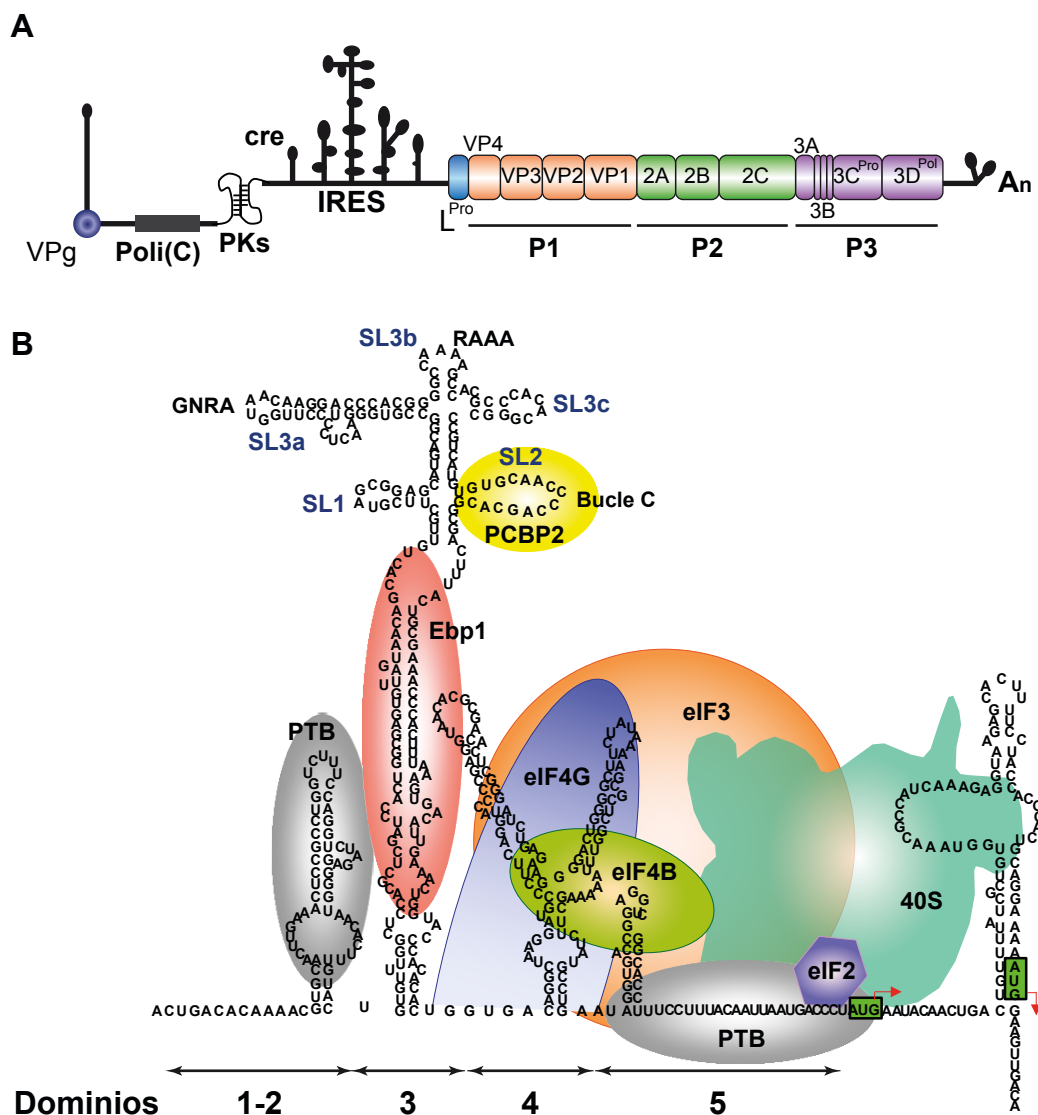


Figura 3. Organización del genoma de FMDV. (A) Representación del genoma de FMDV. Se muestran los elementos estructurales de las regiones 5' y 3' UTR, junto con la composición de la poliproteína. **(B)** Estructura secundaria del IRES de FMDV. Se indica la división en dominios y subdominios, la localización de los motivos conservados del dominio 3, junto con eIFs y proteínas necesarias para su actividad.

El IRES tiene una longitud de 462 nucleótidos, organizados en 5 dominios con una estructura diferenciada (Lozano and Martinez-Salas, 2015) y capacidad de unir varias proteínas, tanto eIFs como otros factores celulares (Martinez-Salas et al., 2015) (Fig.3B). En el extremo 5' del IRES se localiza el dominio 1, que forma parte del elemento *cre* (Fig.3A). El dominio 2 se pliega como una horquilla con una región conservada rica en pirimidinas en la región apical que determina la interacción de PTB (Luz and Beck, 1991). El dominio 3 tiene una posición central y es el más grande de todos. Se pliega adoptando una estructura cruciforme, con una región apical organizada en tres stem-loops (SL1, SL2 y SL3abc) (Fig.3B). SL2 contiene el motivo conservado rico en Cs, implicado en la interacción de PCBP2 (Walter et al., 1999). SL3 (a, b y c) posee dos motivos conservados esenciales para la actividad IRES, GNRA y RAAA (Lopez de Quinto and Martinez-Salas, 1997) (Fig.3B). El motivo GNRA está implicado en interacciones a larga distancia.; la eliminación del motivo provoca una caída drástica de la traducción IRES dependiente (Fernandez-Miragall and Martinez-Salas, 2003; Fernandez-Miragall et al., 2006). La región apical es sustentada por una región de doble banda que presenta algunas bases desapareadas, así como emparejamientos no canónicos (Fernandez et al., 2011). En esta región se ha descrito la interacción de Ebp1, que estimula la actividad IRES en cooperación con PTB (Pilipenko et al., 2000). La región 3' del IRES engloba los dos dominios responsables de la interacción con eIFs. El dominio 4, contiene el sitio de unión a eIF4G (Kolupaeva et al., 1998; Lopez de Quinto and Martinez-Salas, 2000). La horquilla del dominio 5 es responsable de la interacción con eIF4B, mientras que PTB interacciona con el tramo de pirimidinas presente en la región de cadena sencilla (Lopez de Quinto et al., 2001) (Fig.3B).

Generalmente, el estudio de la interacción entre RNA y proteínas se ha centrado en la identificación de factores que reconocen la secuencia primaria del RNA. Sin embargo, hasta la fecha había pocos estudios dedicados a analizar cómo afecta el plegamiento del RNA a la interacción con RBPs. Es por ello que nos propusimos identificar RBPs que reconocieran regiones del IRES de FMDV implicadas en interacciones terciarias. Un ejemplo de estas regiones es el dominio 3 (Fernandez et al., 2011; Lozano et al., 2016).

3. RBPs implicadas en la traducción IRES-dependiente

El RNA de PV no se traduce en un sistema de lisado de reticulocitos de conejo (RRL) a menos que se suplemente con proteínas solubles de HeLa, demostrando que su traducción requiere factores celulares además de eIFs (Semler et al., 1984). La identificación de estas proteínas ha sido posible gracias a ensayos de afinidad usando RNA unido a diferentes matrices, seguido de un análisis proteómico (Pacheco et al., 2008). El avance de las técnicas proteómicas en combinación con marcaje isobárico para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ) (Ross et al., 2004) o marcaje con isótopos estables de aminoácidos en células en cultivo (SILAC) (Ong et al., 2002) ha permitido llevar a cabo estudios cuantitativos de las proteínas purificadas en los ensayos de afinidad y tener una imagen más precisa de las proteínas capaces de interaccionar con RNAs específicos.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las proteínas que interaccionan con el elemento IRES son RBPs nucleares que se desplazan al citoplasma durante la infección viral (Flather et al., 2016). Las RBPs están implicadas en distintas etapas del ciclo del RNA (transcripción, splicing, transporte, estabilidad, traducción o degradación).

Numerosas RBPs comparten una organización modular formada por varios dominios de unión a RNA que funcionan de forma cooperativa (Lunde et al., 2007) (Fig.4).

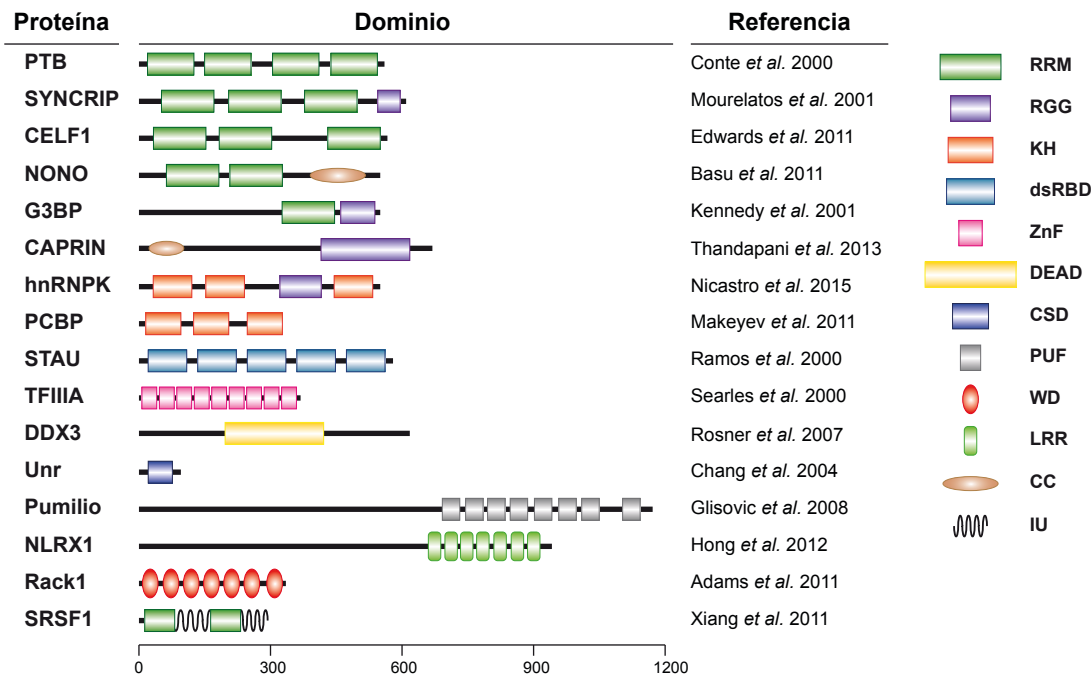


Figura 4. Dominios de unión a RNA en RBPs. Ejemplos representativos de proteínas que contienen dominios típicos de unión a RNA. La línea inferior representa la escala de aminoácidos. Ver detalles en el texto.

a) Motivos de reconocimiento de RNA: Los motivos canónicos de reconocimiento de RNA (RRM) se componen de 80-90 aminoácidos, ricos en residuos Arg y Lys, que son los responsables de interaccionar con el esqueleto fosfodiéster del RNA. Suelen estar presentes en varias copias dentro de una misma proteína. Existen numerosos ejemplos de RBPs que tienen varios RRM, con capacidad de interaccionar con RNAs virales (Fig.4). La proteína PTB, implicada en splicing (Garcia-Blanco et al., 1989), presenta cuatro RRM (Conte et al., 2000), de los que el 3º y 4º están implicados en la interacción con el dominio 2 del IRES de EMCV, mientras que el 2º se une a la región 3' del mismo (Kafasla et al., 2009). La ribonucleoproteína heterogénea nuclear Q (hnRNPQ o SYNCRIP) tiene tres RRM y está implicada en splicing (Mourelatos et al., 2001). Además, reconoce la región 5'-UTR del genoma del virus de la hepatitis murina (MHV), regulando positivamente su traducción (Kim et al., 2004) y su replicación (Liu et al., 2009). Su efecto sobre la traducción de HCV reside en su capacidad para poner en contacto al RNA viral con la subunidad menor del ribosoma 40S durante la formación del complejo de pre-iniciación 48S (Park et al., 2011).

La proteína 1 de la familia tipo CUGBP-Elav (Celf1) presenta dos RRM's en la región N-terminal y otro en el extremo C-terminal (Edwards et al., 2011). Celf1 regula la traducción del mRNA de C/EBP β a través de la unión a su extremo 5'-NTR (Timchenko et al., 1999) y de los mRNAs de ocludina y MYC a través de la competición por el sitio de unión con la proteína 1 de unión a RNA tipo Elav (HuR) (Liu et al., 2015; Yu et al., 2013). Celf1 modula la actividad del IRES del mRNA celular de la serina hidroximetiltransferasa (SHMT1) en cooperación con hnRNPH2 (Fox and Stover, 2009). Otras proteínas presentan dos RRM's, como la proteína de unión a octámeros que contienen el dominio Non-POU (NONO), una proteína de unión a DNA y RNA (Basu et al., 1997). Esta proteína participa en los procesos de maduración del RNA nuclear, también se asocia al RNA del factor de crecimiento por insulina (IGF1) cuando es transportado al citoplasma y regula su traducción en asociación con hnRNPM (Ainaoui et al., 2015).

b) Motivo Arg-Gly-Gly: El motivo repetido Arg-Gly-Gly (RGG) constituye otro de los dominios canónicos de unión a RNA. El motivo RGG está implicado tanto en la unión a RNA-proteína como proteína-proteína, a través de interacciones electrostáticas debidas a la carga positiva de los residuos de arginina. Está presente en la proteína citoplásmica asociada a la activación de la proliferación (Caprin1) o la proteína de unión al dominio SH3 de la proteína Ras (G3BP) (Kennedy et al., 2001; Thandapani et al., 2013) (Fig.4), responsables de la formación de gránulos de estrés (SGs) (Solomon et al., 2007). La formación de los SGs responde a distintos estímulos, que incluyen la fosforilación de eIF2 α (Kedersha and Anderson, 2002). La sobreexpresión de Caprin1 en células estimula la fosforilación de eIF2 α de una manera dependiente de unión a RNA, provocando la supresión global de la traducción (Solomon et al., 2007). La interacción entre la proteína core del flavivirus japonés de la encefalitis (JEV) y Caprin1 es esencial para la propagación viral (Katoh et al., 2013).

c) Motivos de homología a hnRNPK: Otro de los motivos canónicos de interacción con el RNA son los dominios con homología a la proteína hnRNPK (dominios KH), que reconocen DNA y RNA de cadena sencilla (Nicastro et al., 2015). Es un dominio de unos 70 aminoácidos con una secuencia (Ile/Leu/Val)Ile-Gly-X-X-Gly-X-X-(Ile/Leu/Val) localizada en la zona central del dominio esencial para la interacción con moléculas de RNA y DNA. Las proteínas hnRNPE1 y E2, también conocidas como PCBP1 y PCBP2 poseen el dominio KH (Fig.4). Estas RBPs reconocen regiones ricas en C (Makeyev and Liebhaber, 2002), como las presentes en los IRES de los picornavirus del tipo I y II (Gamarnik and Andino, 2000; Walter et al., 1999).

d) Dominios de unión a RNA de doble banda: La interacción entre el RNA y una proteína a través del dominio de unión a RNA de doble banda (dsRBD) es independiente de la secuencia de nucleótidos. El dominio dsRBD reconoce los grupos 2'-OH y el esqueleto de fosfato del RNA. Un ejemplo representativo es la proteína Staufen (STAU), que contiene 5 repeticiones de este dominio (Fig.4) (Ramos et al., 2000). STAU reconoce regiones del RNA estructuradas ricas en pares de bases G:C presentes tanto en la ORF como en la 3'NTR del mRNA (Ricci et al., 2014).

e) Dedos de zinc: Los dominios de dedos de zinc (ZnF) son dominios clásicos de unión a DNA, que también reconocen RNA, como ocurre en el factor de transcripción 3A (TFIIIA) (Fig.4). Los dominios ZnF 1, 2, 3, 5, 7, 8 y 9 de la proteína TFIIIA reconocen DNA, mientras que los ZnF 4 y 6 interaccionan con el RNA 5S (Searles et al., 2000).

f) Otros dominios de unión a RNA: Los dominios de choque frío (CSD), presentes en la proteína upstream N-ras (Unr), que estimula la actividad de los IRES de tipo I (Boussadia et al., 2003; Chang et al., 2004), las cajas DEAD/DEAH, presentes en numerosas helicasas de RNA como DDX3 (Rosner and Rinkevich, 2007), los dominios Pumilio (PUF), presente en la proteína Pumilio1 (Glisovic et al., 2008) y los dominios de Leu repetidas (LRR) presentes en receptores de RNA como receptor X1 tipo NOD (NLRX1) (Hong et al., 2012) son otros de los motivos de unión a RNA frecuentes en RBPs (Fig.4). Algunas RBPs poseen, además de dominios de unión a RNA, motivos tipo “coiled-coil”, que están implicadas en las interacciones proteína-proteína, como NONO o Caprin1 (Fig.4).

También se ha determinado como dominios de unión a RNA motivos típicamente implicados en interacciones proteína-proteína, como los motivos WD (Lau et al., 2009), que son unidades repetidas de 44-60 aminoácidos terminadas en un dipéptido Trp-Asp (WD) (Suganuma et al., 2008). Estos motivos están presentes en el receptor de la quinasa C activada (Rack1) (Adams et al., 2011) o la región N-terminal de Gemin5 (Jin et al., 2016; Xu et al., 2016), entre otras muchas proteínas (Zhang and Zhang, 2015).

g) Proteínas intrínsecamente desestructuradas (UIPs) que reconocen RNA: Las RBPs que contienen motivos canónicos de unión a RNA presentan conectores entre los dominios que permiten adoptar la conformación óptima de la proteína. Sin embargo, los propios conectores, que no adoptan un plegamiento en forma de dominio clásico, reconocen RNA, como ocurre con PTB (Oberstrass et al., 2005), poniendo de manifiesto la importancia de las regiones no estructuradas de las proteínas en la interacción con RNA (Jarvelin et al., 2016). Las regiones intrínsecamente desestructuradas presentes en RBPs son, por un lado, ricas en repeticiones Ser-Arg (S/R) y Arg-Gly (R/G), además de Pro, Gln y Asn y por otro lado, pobres en Ile, Leu, Val, Trp, Phe, Tyr y Cys (Dyson and Wright, 2005). Pueden presentarse en múltiples repeticiones, de manera similar a la asociación de dominios convencionales de unión a RNA (Scherrer et al., 2010).

El hecho de que estos dominios desestructurados sean moldeables implica que las proteínas que los contienen puedan adoptar gran variedad de conformaciones, pudiendo interactuar con diversos ligandos en respuesta a distintos estímulos (Jonas and Izaurralde, 2013), como el caso del factor de splicing 1 rico en Ser/Arg (SRSF1) (Fig.4). La fosforilación de SRSF1 provoca un cambio conformacional que influye en su capacidad de reconocer RNA (Xiang et al., 2013). Uno de los mayores desafíos que presenta la caracterización de nuevas RBPs con una conformación intrínsecamente desestructurada es la determinación de la región de la proteína responsable del reconocimiento del RNA.

3.1. Gemin5

Gemin5 es una RBP que reconoce el IRES de FMDV a través de su extremo C-terminal (Pineiro et al., 2013). Esta región de la proteína carece de motivos canónicos de unión

a RNA; por ello, nuestro interés se ha centrado en caracterizar la región de la proteína responsable de interaccionar con el IRES. Gemin5 es una proteína con una distribución principalmente citoplasmática que se describió por primera vez como un componente del complejo de supervivencia de las neuronas motoras (SMN complex), con el que colocaliza en las gemas nucleares (Gubitz et al., 2002; Hao le et al., 2007). Gemin5 es la proteína responsable de reconocer los RNAs pequeños nucleares (snRNAs) a través de la secuencia consenso (A (U)₅₋₆G) seguida de una horquilla (Battle et al., 2006; Yong et al., 2010), para el ensamblaje de las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs) que constituyen la maquinaria esencial para los procesos de splicing (Grimm et al., 2013; Nilsen, 2003) (Fig.5A). La depleción de Gemin5 reduce la interacción entre el complejo SMN y los snRNAs en el ensamblaje de las proteínas seven members (Sm) (Shpargel and Matera, 2005). La región N-terminal de Gemin5, que contiene catorce repeticiones del dominio WD divididos en dos regiones (WD1 y WD2), interacciona con los snRNAs en el surco formado entre WD1 y WD2, a través de los aminoácidos Tyr15, Glu197, Trp14 y Phe 381 (Jin et al., 2016; Xu et al., 2016).

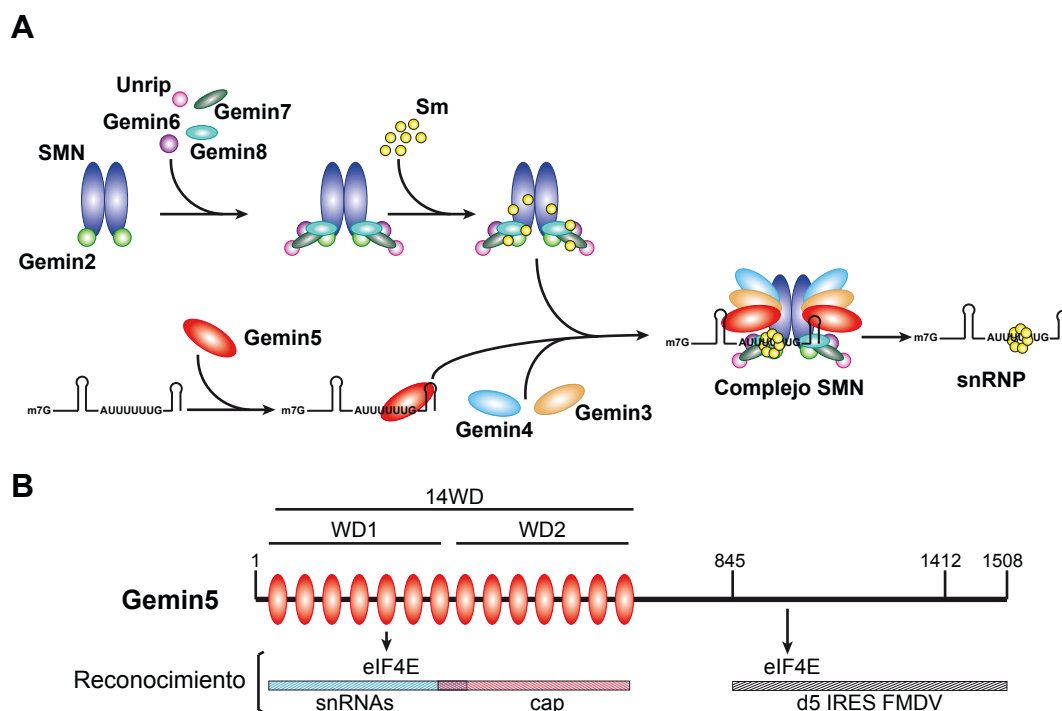


Figura 5. Gemin5, una proteína multifuncional con múltiples ligandos. (A) Esquema del ensamblaje del complejo SMN implicado en la formación de los snRNPs. Gemin5 reconoce la secuencia Sm de los snRNAs, sobre la que se ensambla el anillo heptamérico de proteínas Sm. **(B)** Representación de la estructura de Gemin5. Se indican las regiones implicadas en el reconocimiento de snRNAs, la estructura cap y eIF4E (barra azul y rosa, respectivamente). La barra gris indica la región implicada en la interacción con el IRES de FMDV. Los números indican la posición de los aminoácidos; los óvalos representan las repeticiones WD.

El complejo SMN se compone de las proteínas SMN, Gemin6, Gemin7, Gemin8 y unrip, junto con Gemin3, Gemin4 y Gemin5-snRNA (Fig.5A). El heterotetrámero formado por dos proteínas SMN unidas a dos Gemin2 se une con el complejo formado por Gemin6,

Gemin7, Gemin8 y unrip (Kroiss et al., 2008). Sobre estas proteínas se unen siete proteínas Sm (B, D1, D2, D3, E, F y G) que conformarán los snRNPs. Los snRNAs son reconocidos por Gemin5 en el citoplasma. En el complejo SMN se produce la asociación del anillo heptamérico de proteínas Sm sobre los snRNAs, formando los snRNPs que serán transportados al núcleo, mientras que el complejo SMN se disocia y Gemin5 queda libre (Battle et al., 2006; Yong et al., 2010).

Gemin5 es un regulador negativo de la traducción, tanto la que se inicia a través de la estructura cap, como la dirigida por los IRES de FMDV y HCV (Pacheco et al., 2009). Gemin5 posee dos motivos de interacción con eIF4E, uno entre el cuarto y el quinto dominio WD y otro en la región carboxilo terminal (Fierro-Monti et al., 2006) (Fig.5B), y queda retenida en resinas acopladas a m⁷GTP (Bradrick and Gromeier, 2009). Recientemente se ha determinado cristalográficamente la estructura del complejo Gemin-m⁷GTP, que se produce a través de los residuos Tyr474 y Lys641, presentes en la región WD2 (Fig.5B) (Jin et al., 2016; Xu et al., 2016). La capacidad de unir eIF4E, así como a la estructura cap sugieren que el efecto represor de la traducción de Gemin5 se puede deber a la competición con eIF4E por la estructura cap, impidiendo el ensamblaje de eIF4F (Pineiro et al., 2015).

Nuestro laboratorio identificó Gemin5 asociada al IRES de FMDV y HCV mediante ensayos de riboproteómica e inmunoprecipitación (Pacheco et al., 2009). Cantidades crecientes de Gemin5 inhiben la actividad IRES en RRL. De la misma manera, la depleción de la proteína mediante shRNAs en células BHK-21 aumenta la actividad IRES de un plásmido bicistrónico que contiene el IRES de FMDV o HCV. Posteriormente se determinó que la proteína interacciona con el IRES de FMDV a través del dominio 4, la región entre el dominio 4-5 y la horquilla del dominio5 (Fig.5B). Como hemos visto, el dominio 5 proporciona el sitio de unión para PTB (Fig.3). El efecto represor de Gemin5 se debe, al menos en parte, a la competición con PTB por el sitio de unión al IRES (Pineiro et al., 2013). Sin embargo, al inicio de esta Tesis doctoral no se conocía con precisión la región de la proteína responsable de la interacción con el IRES de FMDV, ni tampoco del efecto represor de la traducción dirigida por IRES.

4. Picornavirus

La familia *Picornaviridae* engloba a más de 20 géneros (www.ictvonline.org) entre los que se encuentran los enterovirus, aftovirus, cardiovirus o hepatovirus. Son virus pequeños, con cápsida icosaédrica sin envuelta. Su genoma es un RNA de cadena sencilla con orientación positiva (RNA+) que varía desde 7,2 hasta 8,5 kb. Al igual que los mRNAs celulares contiene una única ORF flanqueada por dos NTRs (Fig.3A). Sin embargo, al contrario que los mRNAs celulares, la región 5'-NTR es más larga (700-1200 nucleótidos) y no contiene cap, sino que está unida covalentemente a la proteína VPg (Lee et al., 1977). Además de otros motivos estructurales esenciales para la actividad viral, esta región contiene el elemento IRES. La región 3'-NTR es más corta y está poliadenilada. La ORF se traduce como una poliproteína que es proteolizada por proteasas virales, dando lugar a las proteínas maduras (Fig.3A).

La poliproteína se procesa generando los precursores de las proteínas maduras (P1, P2 y P3) (Hellen et al., 1989). P1 codifica las proteínas estructurales de la cápsida (VP1, VP2, VP3 y VP4). En la región P2 se localiza la proteasa 2A, la viroporina 2B y la helicasa 2C (Martínez-salas, 2017). A partir de P3 se liberan la proteína 3A, implicada en replicación y reorganización de la membrana celular; 3B (o VPg), que actúa como cebador en la replicación después de que se poliuridinice (Nayak et al., 2005); la proteasa 3C y la polimerasa dependiente de RNA 3D (Whitton et al., 2005). A diferencia de la mayoría de los picornavirus, el genoma de los aftovirus codifica una proteína 2A sin actividad proteasa, pero con actividad hidrolasa en *cis* (CHYSEL) que provoca el corte del enlace peptídico, y con ello la parada de la elongación, seguido de reiniciación de la traducción en el 50% de los RNAs (Donnelly et al., 2001). Sin embargo, codifica la proteasa L, que se encuentra en el extremo N-terminal de la poliproteína (Strebel and Beck, 1986).

La infección de células por picornavirus comienza con la entrada del virus en la célula por endocitosis mediada por receptor, seguido de la liberación del genoma al citoplasma (Lawrence, 2017). El RNA viral recluta al ribosoma a través del elemento IRES para generar la poliproteína viral que es procesada dando lugar a las proteínas necesarias para la replicación viral (Fig.6). A partir del RNA genómico, de orientación positiva, se sintetiza un RNA de orientación negativa que actúa como molde en sucesivas rondas de replicación produciendo múltiples copias del genoma. Estas copias serán traducidas, replicadas o empaquetadas en los viriones. La liberación de partículas infecciosas suele tener lugar a través de lisis celular, aunque en algunos casos se ha descrito que se pueden liberar en vesículas que transportan varios viriones sin necesidad de lisar la célula hospedadora (Bird et al., 2014).

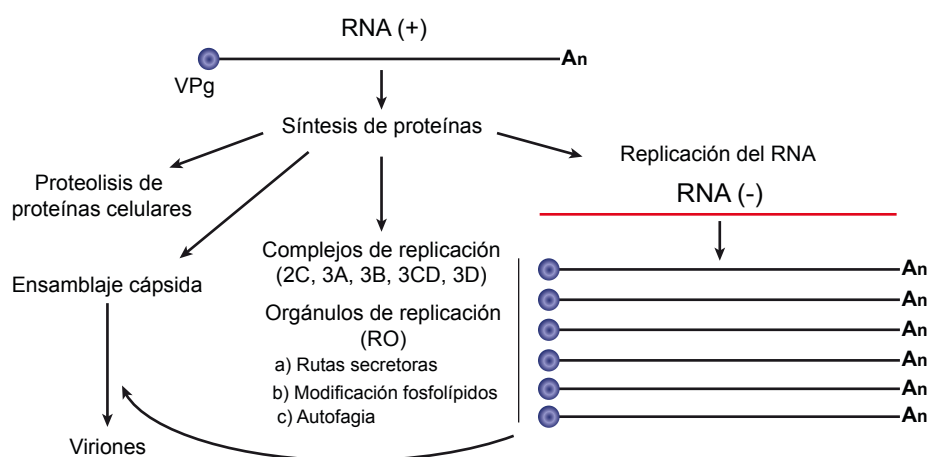


Figura 6. Representación esquemática del ciclo de replicación de picornavirus.

Los picornavirus, entre otros virus con genoma RNA de orientación positiva, secuestran y reorganizan las membranas celulares para formar estructuras en las que tiene lugar la replicación viral y la encapsidación de los nuevos virus. Estas estructuras, llamadas orgánulos de replicación (RO) (Fig.6), tienen una composición lipídica específica y contienen proteínas celulares que, junto con las virales, forman un entorno óptimo para la replicación (Miller and Krijns-Locker, 2008).

El proceso por el que se forman estos orgánulos es aún controvertido. Se han propuesto tres mecanismos que pueden llevar a la formación de los RO. Uno de estos mecanismos propone que puede llevarse a cabo aprovechando las rutas secretoras celulares, en concreto el transporte anterógrado y retrógrado entre los compartimentos celulares ER y el Golgi (Belov and van Kuppeveld, 2012). Otro de los mecanismos propone que puede deberse a la alteración de las rutas de síntesis de lípidos, ya que la infección estimula la síntesis de fosfolípidos esenciales para la formación de membranas con bicapa lipídica. Otros virus activan la expresión de la sintasa de ácidos grasos (FAS) (Yang et al., 2008). Por último, las rutas de autofagia podrían inducir la generación de estructuras de doble membrana, además de inhibir la respuesta antiviral, como se ha descrito para las infecciones de HCV y Dengue (DENV) (Ke and Chen, 2011; Shrivastava et al., 2011).

5. Transporte de proteínas a través de rutas secretoras

Los ribosomas asociados al ER son responsables del 75% de la traducción en células HEK293, además de ser menos sensibles a la inhibición por la fosforilación de eIFs (Reid and Nicchitta, 2015). Sin embargo, las proteínas citosólicas sintetizadas en estos orgánulos tienen que ser transportadas hasta su localización celular definitiva. El transporte se lleva a cabo a través de las rutas secretoras celulares que implican varios compartimentos celulares: el ER, el compartimento intermedio ER-Golgi (del inglés, ERGIC) y el Golgi, que se divide a su vez en la región *cis*, media, *trans* y la red trans-Golgi (TGN). El transporte entre estos orgánulos está mediado por proteínas de membrana divididas en dos clases con funciones diferenciadas: COPI y COPII (Duden, 2003) (Fig.7).

a) Transporte ER-Golgi mediado por COPII: En los ribosomas asociados al RE se sintetizan proteínas que deben ser transportadas al Golgi para su maduración y exportación. Este proceso es conocido como transporte anterógrado y está mediado por proteínas tanto citosólicas como ancladas a membrana, esenciales para la viabilidad celular. La formación de vesículas en el ER se inicia cuando la proteína transmembrana intercambiadora de guanina (GEF) Sec12 cataliza el intercambio de GDP por GTP de Sar1a, asociándose a la membrana del retículo (Barlowe et al., 1993; Barlowe and Schekman, 1993; Huang et al., 2001) (Fig.7). Esta unión permite el reclutamiento de los complejos Sec23/24 y posteriormente Sec13/31, que inducen la formación de vesículas mediante la deformación de la membrana (Barlowe et al., 1994). Tras la liberación de las vesículas al ERGIC, la proteína Sec23, que tiene actividad GTPasa, cataliza la hidrólisis del GTP unido a Sar1, lo que provoca que deje de estar asociada a la membrana del ER y se desestabilicen los complejos Sec23/24 y Sec13/31, con lo que se detiene la formación de nuevas vesículas (Antonny et al., 2001). Las vesículas que se liberan deben contener proteínas bien plegadas, en un proceso mediado por Sec23/24. Las proteínas que serán exportadas contienen señales en la región citosólica de su secuencia que permiten el reconocimiento para su carga, por ejemplo motivos di-Phe-Ala (Nufer et al., 2002) o señales de carga diácidas, con Asp y Glu (Ma et al., 2001).

b) Transporte retrógrado mediado por COPI: las vesículas procedentes del ER llegan al Golgi y liberan su carga de proteínas, entre las que se encuentran proteínas propias del ER y bicapas lipídicas del mismo. El transporte retrógrado permite mantener el equilibrio

de proteínas y lípidos de las rutas de secreción. Este equilibrio es esencial para el mantenimiento de los orgánulos y las rutas de secreción, y constituye una de las dianas de los virus para inhibir la respuesta inmune (Dodd et al., 2001). La formación de vesículas para el transporte retrógrado se inicia cuando se produce el intercambio de GDP por GTP del factor de ribosilación de ADP-1 (ARF1) (Fig.7). Este proceso está mediado por el factor de intercambio de nucleótidos de guanina del Golgi para la resistencia a brefeldina A (GBF1) (ARFGEF), que dispara el reclutamiento de la proteína desde el citoplasma a la membrana, donde recluta el coatómero para la formación de vesículas COPI (Kawamoto et al., 2002; Zhao et al., 2002) (Fig.7).

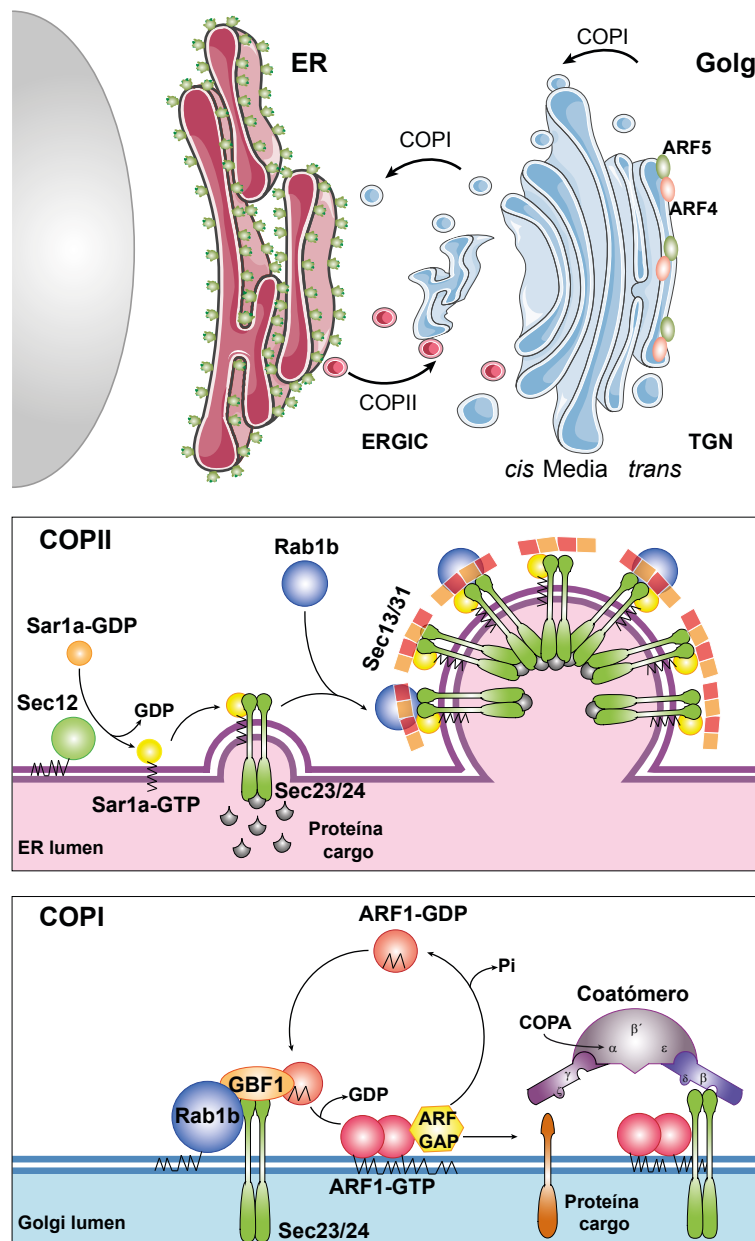


Figura 7. Rutas de transporte de proteínas entre el retículo endoplásmico (RE) y el Golgi. Parte superior: distribución del RE y el Golgi, las zonas que los conforman y el sentido del transporte de proteínas entre ellos. Se indica la localización de las proteínas ARF4 y ARF5. Parte media: esquema del mecanismo del transporte anterógrado (COPII). Parte inferior: transporte retrógrado (COPI). Ver detalles en el texto.

El coatómero es un complejo proteico citosólico de 700 kDa, formado por 7 subunidades (α , β , β' , γ , δ , ϵ y ζ) responsable de la formación de las vesículas que se liberarán al citoplasma con destino al ER o el Golgi (Gaynor et al., 1998). Tras el transporte de las proteínas, la molécula de GTP unida a ARF1 es hidrolizada por GTPasas. ARF1-GDP se desplaza al citoplasma provocando que se desorganice el coatómero y se detenga el transporte COPI. La discriminación de las partículas que son cargadas radica en las subunidades α , β' y ϵ COP, que reconocen motivos di-Lys (KKXX) (Letourneur et al., 1994; Schroder-Kohne et al., 1998).

La proteína ARF1 es un elemento clave para el transporte de proteínas mediado por COPI. ARF1 pertenece a una familia compuesta por 21 proteínas, que incluye 6 ARFs. Se dividen en tres clases en base a su homología de secuencia. La clase I incluye ARF1, ARF2 y ARF3; la clase II engloba a ARF4 y ARF5; ARF6 es el único miembro de la clase III. Las proteínas ARFs controlan el tráfico de membrana y la estructura de orgánulos a través de cambios en su estado de activación, asociado a la unión de GTP (activo) o GDP (inactivo). Al contrario de lo que le ocurre a las ARFs de clase I, ARF4 y ARF5 no alteran su localización celular en función de su estado de activación, permaneciendo siempre asociadas al Golgi (Fig.7) (Donaldson and Jackson, 2011; Jackson and Bouvet, 2014). Un regulador de las proteínas ARFs es GBF1, que interacciona con proteínas virales, como 3A de poliovirus, activando ARF5 y permitiendo la replicación viral (Belov et al., 2008). También se ha descrito la capacidad de las proteínas ARF4 y ARF5 de interaccionar con glicoproteínas del DENV para favorecer la replicación y secreción de partículas virales (Kudelko et al., 2012). Sin embargo, a pesar de ser proteínas esenciales en la regulación de la replicación viral de HCV (Farhat et al., 2016) no se ha descrito la interacción entre estas proteínas y el genoma viral.

Además de las ARFs, la familia de proteínas Rab, con actividad GTPasa, que incluye 38 proteínas diferentes en humanos, es clave para distintos procesos celulares, entre los que se encuentra el transporte celular (Park, 2013). Una de las proteínas de esta familia es Rab1b, la proteína efectora de GBF1 (Avarez et al., 2003; Monetta et al., 2007). Rab1b interacciona con las proteínas de la ruta COPII, Sec23, Sec24 y Sec31, regulando su dinámica (Slavin et al., 2011). Además, Rab1b controla la formación de partículas virales de ebolavirus a través de la regulación del transporte mediado por COPI (Yamayoshi et al., 2010), así como en el tráfico de glicoproteínas del virus Herpes simple desde el ER a los compartimentos de ensamblaje (Zenner et al., 2011). Por lo tanto, Rab1b está implicada en los dos mecanismos de transporte ER-Golgi: COPI y COPII.

Hasta la fecha no se ha descrito la interacción de ninguna de las proteínas implicadas en el transporte celular (COPI o COPII) con el genoma picornavirus, ni la posible implicación del elemento IRES en esta interacción. Nuestro trabajo ha tratado de analizar, en primer lugar el conjunto de factores celulares que interaccionan con el IRES, y en segundo lugar, si alguno de estos factores celulares podría interaccionar directamente con el IRES. Estos datos podrían sugerir que el IRES está implicado en funciones nuevas, además de dirigir la traducción de la proteína viral.





OBJETIVOS

Los mRNAs que contienen elementos IRES son reconocidos por la maquinaria traduccional en condiciones de inhibición de la traducción dependiente de la estructura cap. La interacción de los IRES con proteínas celulares permite regular su actividad. El estudio de estas proteínas es esencial para entender los mecanismos que regulan la traducción dependiente de IRES.

Los objetivos abordados en esta Tesis doctoral han sido:

1. Identificación de la región de la proteína Gemin5 responsable de la unión con el dominio 5 del IRES de FMDV.
2. Determinación de la región de Gemin5 responsable de la reducción de la actividad IRES.
3. Análisis de nuevas proteínas que reconocen diferencialmente subdominios estructurales del IRES.
4. Estudio de la afinidad por los subdominios del dominio 3 y del efecto sobre la actividad IRES de las proteínas identificadas implicadas en distintos procesos celulares.
5. Caracterización de proteínas asociadas diferencialmente a un RNA funcional que contiene el IRES mediante marcaje isotópico con aminoácidos pesados en células en cultivo (SILAC).
6. Caracterización de la proteína de unión a RNA UPF1 como un nuevo factor que reconoce el IRES.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Construcciones

a) Plásmidos para expresar proteínas en bacterias: Para la expresión de las proteínas en *Escherichia coli* se usó el vector pET-28a (+) (Novagen). La construcción pET-G5₈₄₅₋₁₄₃₆ se generó en dos pasos; primero un producto de PCR con los oligonucleótidos G5-9s y G5-10as sobre el molde pcDNAG5FLAG (Pineiro et al., 2013) vía EcoRI y NdeI (Tabla 1). Sobre este plásmido se insertó el producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos G5-11s y G5-12as, vía EcoRI y XhoI. pET-G5₁₂₈₇₋₁₅₀₈ se obtuvo con la pareja de oligonucleótidos G5-13s y G5-14as, vía EcoRI y XhoI. Para obtener pET-G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈ se digirió pcDNA3/XpressG5₁₃₈₃₋₁₅₀₈ con EcoRI y HindIII; el fragmento liberado se insertó en pET-28a (+) digerido con las mismas enzimas. El plásmido pYES-G5₈₄₅₋₁₅₀₈, usado para expresar ese fragmento de G5 en *Saccharomyces cerevisiae*, se generó mediante PCR con los oligonucleótidos G5-17s y G5 18as. Este producto se digirió con KpnI y NotI para insertarlo en pYES2 (Tabla 1).

El plásmido pET-RPS25 se obtuvo insertando el producto de la PCR resultante de la pareja de oligonucleótidos RPS25-1s y RPS25-3as sobre pCMVhRPS25 (Origene #SC107957), en pET-28a(+), vía NheI y NotI. La construcción pET-CUGBP1 se obtuvo vía NheI y NotI en pET-28a(+) con el producto de PCR de los oligonucleótidos CUG-1s y CUG-2as sobre pCMV6-EntryCUGBP1 (Origene #RC221943). Para obtener pET-NONO se realizó una PCR con los oligonucleótidos NONO-1s, NON-2as y el molde pSCT-GAL93-NONO (Addgene plasmid #46325, (Kowalska et al., 2012)) y se digirió con NheI y SalI. pET-Rack1 se obtuvo con el producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos Rack1-1s y Rack1-2as sobre pGEXKG-Rack1 (Francisco-Velilla et al., 2016), vía NheI y SalI. El vector pET-SYNCRIP se obtuvo a partir del producto de PCR de los oligonucleótidos SYN-1s, SYN-2as y el molde pGEXKG-SYNCRIP (Francisco-Velilla et al., 2016), vía NheI y XhoI. pET-Caprin se obtuvo insertando el fragmento BamHI/XhoI de pCMVTag2B-Caprin en pET-28a(+).

b) Plásmidos de expresión en células animales: Los plásmidos para la sobreexpresión en células de mamífero se basaron en el plásmido pcDNA3/Xpress (Fernandez-Chamorro et al., 2014), que permite la expresión de proteínas fusionadas a la etiqueta HIS-Xpress en el extremo N-terminal. Para ello el producto de digestión de pcDNA3.1-HIS6Daxx (Pineiro et al., 2013) con HindIII/EcoRI se insertó en pcDNA3.1/ZEO digerido con esas enzimas. Para generar pcDNA/XpressG5, se digirió pRSETB13WD con BamHI/EcoRI y el fragmento se introdujo en pcDNA3/Xpress, obteniendo pcDNA3/Xpress13WD. Posteriormente el producto de PCR con los oligonucleótidos G5s y G5 as (Tabla 1) se insertó sobre pcDNA3/Xpress13WD vía EcoRI y NotI. pcDNA3/XpressG5₈₄₅₋₁₅₀₈ se obtuvo en dos pasos. Primero, el producto de PCR con el par de oligonucleótidos G5-1s y G5-2as se insertó en pcDNA3/Xpress vía BamHI/EcoRI.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sobre esta construcción se introdujo el producto de PCR con los oligonucleótidos G5-11s y G5-6as vía EcoRI/NotI. El plásmido pcDNA3/XpressG5₈₄₅₋₁₄₃₆ se generó de manera similar, usando los oligonucleótidos G5-11s y G5-12as en la segunda PCR. Para obtener pcDNA3/XpressG5₁₂₈₇₋₁₅₀₈ se realizó una PCR con los oligonucleótidos G5-5s y G5-6as (Tabla 1). El producto resultante se introdujo en pcDNA3/Xpress vía con BamHI/NotI.

Tabla 1. Oligonucleótidos

Plásmido	Molde PCR	Nombre	Secuencia(5'-3')
pET-G5 ₈₄₅₋₁₄₃₆	pcDNA3G5FLAG	G5-9s	CATATGGCTCGTTCCTTGCTTCCCC
		G5-10as	CCACCA GAA TTCA TACAGAC
	pcDNA3/XpressG5 ₈₄₅₋₁₄₃₆	G5-11s	TGAA TTCTGGTGGTCTCTCTC
		G5-12as	GCTAAGCTTCATTTGGTTAACTCAGG
pET-G5 ₁₂₈₇₋₁₅₀₈	pcDNA3-G5FLAG	G5-13s	GGGGAATTCTGGTGGTCTCTC
		G5-14as	TTGCTCGAGTCACATACAGAAAGGTCTGGCAGTG
pYES-G5 ₈₄₅₋₁₅₀₈	pcDNA3/XpressG5 ₈₄₅₋₁₅₀₈	G5-17s	AAGGTACCATGCGGGTTCTCATC
		G5-18as	AAGCGGCGCTCACATACAGAAAGGTCTGGC
pET-RPS25	pCMV/hRPS25	RPS25-1s	GCTAGCATGCCGCTAAAGGACGACAAAG
		RPS25-3as	GTACAGCTGGTTGGAACCTATTCATG
pET-CUGBP1	pCMV6-Entry CUGBP1	CUG-1s	GCTAGCATGAACGGCACCCCTGGACC
		CUG-2as	CGCGTGTAAGGCTTGCTGTCAATTC
pET-NONO	pSCT-GAL93-NONO	NONO-1s	GCTAGCGCATTTGTTGGTACCCCTGCAG
		NONO-2as	TTAGTATCGGCGACGTTTGTGGGG
pET-Rack1	pGEXKG-Rack1	Rack1-1s	GCTAGCATGACTGAGCAGATGACCCCTCG
		Rack1-2as	ATGTCGACTCAGCGTGTGCCAAT
pET-SYNCRIP	pGEXKG-SYNCRIP	SYN-1s	GCTAGCATGGCTACAGAACATGTTAATGGAATGG
		SYN-2as	ATCTCGAGTCATTGTAAACAGGTCAAG
pcDNA3/XpressG5	pcDNA3-G5FLAG	G5s	TGAA TTCTGGTGGTCTCTCTC
		G5as	TCTAGATCACATACAGAAAGTCTG
pcDNA3/XpressG5 ₈₄₅₋₁₅₀₈	pcDNA3G5FLAG	G5-1s	GGA TCCGCTCGTTCCTTG
		G5-2as	CCACCA GAA TTCA TACAGAC
		G5-11s	TGAA TTCTGGTGGTCTCTCTC
		G5-6as	CCACCA GAA TTCA TACAGAC
pcDNA3/XpressG5 ₈₄₅₋₁₄₃₆	pcDNA3G5FLAG	G5-11s	TGAA TTCTGGTGGTCTCTCTC
		G5-12as	GCTAAGCTTCATTTGGTTAACTCAGG
pcDNA3/XpressG5 ₁₂₈₇₋₁₅₀₈	pETG5 ₁₂₈₇₋₁₅₀₈	G5-5s	GGATCCCTGGTGGTCTCTCTC
		G5-6as	CCACCA GAA TTCA TACAGAC
pcDNA3/XpressG5 ₁₃₈₃₋₁₅₀₈	pcDNA3-G5FLAG	G5-3s	GCTTGGTACCAATGATCCGACAAACACC
		G5-4as	CTCTAGAGGATCCCGGGTCAATAC
pcDNA3/XpressG5 ₁₂₉₇₋₁₄₁₂	pcDNA3-G5FLAG	G5-7s	GGTACCGCCAAATTCAGTGCTGGG
		G8-8as	TTACTGCTCTGCTTCTACTTC
pTaggedCAP	pTaggedFMDV	Mut-1s	CCTTTACAAATTAATGACCTGAATTCATGGAAGCGCAAAAAC
		Mut-2as	ATGTTTTTGGCGTCTTCCATGAATTCAGGGTCAATTAATTGTAAG
pG5 ₁₃₈₃₋₁₅₀₈	pGEM-p85	G5-19s	GGCGGTACCATGATCCGACAAACACC
		G5-20as	GAACGCGGCTACAAATTAATAC pG
pBSMrnaStrep/D3	pBIC	tRNA-1s	GGGGTCGACGTGTTTGGCTCCACGCTCG
		tRNA-2as	GACATGAAACTGGTACCCACACGACGTCCCG
pBSMrnaStrep/Bucle C	pBIC	tRNA-3s	GGGGTCGACGTGTTGTA GCGGAGCATGACGG
		tRNA-4as	GCAACCCACGACGCGGACGTCCCG
pBSMrnaStrep/SL3abc	pBIC	tRNA-5s	CACGTGCGACTCGTAG
		tRNA-6as	AGACGTCGTGCTG
pBSMrnaStrep/SL3a		tRNA-7s	TCGATGGGAACTCCTCCTTGGTAACAAAGGACCCACGGGACGT
		tRNA-8as	CCCGTGGGTCTGTTACCAAGGAGGAGTTCCAC

pcDNA3/XpressG5₁₃₈₃₋₁₅₀₈ se obtuvo al insertar el producto de PCR con los oligonucleótidos G5-3s y G5-4as sobre el plásmido pcDNA3/Xpress a través de KpnI/BamHI. Para generar pcDNA3/XpressG5₁₂₉₇₋₁₄₁₂ se introdujo el producto de PCR de los oligonucleótidos G5-7s y G5-8as en el plásmido pcDNA3/Xpress tras digerir con KpnI y NotI.

La sobreexpresión de UPF1 se realizó usando el plásmido RNT1-GFP (Addgene plasmid # 17708, (Mendell et al., 2002))

Los plásmidos que expresan los RNAs etiquetados con horquillas reconocidas por la proteína MS2 derivan del vector pTaggedIRES (Addgene plasmid #35570 (Tsai et al., 2011)). El plásmido pIRES-luc se generó insertando el IRES de FMDV vía EcoRI/BamHI en pTaggedIRES. pCAP-luc se obtuvo tras generar un sitio EcoRI en pIRES-luc con los oligonucleótidos Mut-1s y Mut-2as; se digirió con EcoRI y se autoligó.

c) Plásmidos para expresar RNAs: El plásmido pG5₁₃₈₃₋₁₅₀₈, usado para la obtención de RNA mediante transcripción *in vitro*, se obtuvo al digerir el plásmido pG5Ct_{Δ1365-1508} con KpnI y XbaI y sustituir el fragmento liberado por el producto resultante de la PCR con los oligonucleótidos G5-19s y G5-20as sobre el molde pHIS-Gemin5/845-1508 (Pineiro et al., 2012).

Los plásmidos para la obtención de los RNAs quimera con los subdominios del D3 del IRES se obtuvieron partiendo del plásmido pBSMrnaStrep (Ponchon et al., 2009), que contiene el promotor constitutivo *lpp*. Para obtener pBSMrnaStrep/D3 se insertó el producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos tRNA-1s y tRNA-2as, usando como molde pBIC (Martinez-Salas et al., 1993), vía SalI y AatII. Los plásmidos pBSMrnaStrep/Bucle C y pBSMrnaStrep/SL3abc se obtuvieron con los oligonucleótidos tRNA-3s/tRNA4as y tRNA-5s/tRNA-6as, respectivamente. Para obtener el plásmido pBSMrnaStrep/SL3a se diseñaron los oligonucleótidos tRNA-7s y tRNA-8as, que tienen la secuencia de interés en orientación positiva y negativa. Se incubó 10 μL de cada oligonucleótido (200 ng/μL) durante 2 min a 90°C en Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM y se dejaron enfriar lentamente hasta 15-20°C. El producto del anillamiento se ligó al plásmido pBSMrnaStrep, previamente digerido con SalI y AatII.

La secuencia de nucleótidos de todas las construcciones fue verificada mediante secuenciación (MacroGen)

2. Bacterias

Los experimentos de clonación se realizaron usando células termocompetentes *E.coli* DH5α (*supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*) (Hanahan, 1983). Los experimentos de inducción y purificación de proteínas recombinantes se llevaron a cabo usando células electrocompetentes *E.coli* BL21(DE3) (*huA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm]ΔhsdSλ DE3 = λ sBamHIΔEcoRI-B int::lacI::PlacUV5::T7 gene1*) *i21 Δnin5*) (New England Biolabs)

a) Transformación por choque térmico: A una mezcla de plásmido en TE (Tris 10 mM, pH 8, EDTA 2,5 mM) (10 ng/10 μL) se añadió 100 μL de células *E.coli* DH5α termocompetentes y se incubó 30 min en hielo. Se aplicó un choque térmico (1 min a 42°C y 2 min en hielo) y se incubó 1 h a 37°C con 900 μL de medio Luria-Bertani (LB).

Finalmente, se sembró el cultivo en placas de LB-agar con antibiótico y se incubaron durante 16-20 h a 37°C.

b) Transformación por electroporación: Una mezcla de plásmido en TE (10 ng en 9 µL) con 40 µL de bacterias *E.coli* BL21 (DE3) electrocompetentes en cubetas de electroporación de 0,2 cm (BioRad) se incubó 5 min en hielo, antes de dar un pulso (200 Ω, 25 µF, 2,5 kV y tiempo constante). Se añadió 900 µL de LB antes de transferir la mezcla a tubos de 5 mL para incubarlo 1 h a 37°C con agitación. Las bacterias se sembraron en placas de LB-agar con antibiótico y se incubaron durante 16-20 h a 37°C.

3. Purificación de proteínas

Bacterias *E.coli* BL21(DE3) transformadas con los plásmidos pET-G5₈₄₅₋₁₄₃₆, pET-G5₁₂₈₇₋₁₅₀₈, pET-G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈, pET-28aLIC-ARF5 (Addgene plasmid # 3557), pET-RPS25, pET-CU-GBP1, pET-NONO, pET-Rack1, pET-SYNCRIP, pPB-N-His-Rab1b (abm# PV033914) pET-UPF1 115-914 (Melero et al., 2012) se inocularon en LB+Kanamicina. El preinóculo se diluyó 100 veces y se continuó incubando hasta alcanzar una densidad óptica (D.O) de 0,6 (600 nm), antes de inducir la expresión de proteínas con Isopropil-D-1-thiogalactopiranosido (IPTG) 0,5 M durante 2 a 4 h. Las bacterias se centrifugaron a 6700 g, 4°C, resuspendiendo el sedimento en Binding Buffer (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM) y DTT 5 mM (1 ml por 0,1 g de sedimento). Se lisaron las bacterias mediante presión y se centrifugaron a 12000 g, 4°C durante 1 hora. El sobrenadante se cargó en columnas His-GraviTrap (Healthcare) equilibradas con Binding buffer. Tras dos lavados con Binding buffer, las proteínas se eluyeron con Buffer de elución (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 500 mM), se recogieron fracciones de 1 ml. Tras analizar la calidad de las proteínas obtenidas en las fracciones, se dializaron (SpectralPor, Mw 3,5) 4 h a 4°C en Buffer de diálisis (NaH₂PO₄ 20 mM pH 6,8, NaCl 1 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM), seguido de buffer de diálisis con Glicerol 50%, durante 16-20 h a 4°C.

4. Interacción RNA-proteína

a) Síntesis de RNA: La transcripción *in vitro* se realizó usando T7 RNA polimerasa, DNA linealizado (0,5 µg/µL), en Buffer T7 Polimerasa (Tris-HCl 40 mM pH 7,9, MgCl₂ 6 mM), DTT 50 mM y rNTPs 0,5 mM en un volumen final de 10 µL, 2 h a 37°C. El RNAs que expresa G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈ se consiguió linearizando con HindII el plásmido pG5₁₃₈₃₋₁₅₀₈. El RNA bicistrónico se obtuvo linearizando el plásmido pBIC-AVR11-NotI (Lopez de Quinto et al., 2002) con NotI. Los subdominios del dominio 3 del IRES se obtuvieron linearizando con SmaI (D3, Bucle C y SL3a) y BamHI (SL3abc) (Fernandez-Miragall et al., 2006; Ramos and Martinez-Salas, 1999). El RNA sintetizado se extrajo con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol y se resuspendió en TE.

El marcaje uniforme del RNA se llevó a cabo usando ³²P-αCTP (500 Ci/mmol). Las sondas se separaron de los isótopos no incorporados en columnas G-25 (HealthCare) antes de precipitarlas y resuspenderlas a una concentración de 0,04 pmol/µL. La integridad de las sondas se analizó en geles desnaturalizantes (6% acrilamida, 7 M urea).

b) Crosslink de RNA con proteínas mediante luz UV: Las sondas de RNA marcadas uniformemente con ^{32}P - αCTP (0,04pmol) se incubaron con distintas cantidades de proteínas purificadas durante 15 min a temperatura ambiente en 1,6 μL de Buffer C (HEPES 50 mM pH 7,9, KCl 100 mM, Glicerol 10%, IGEPAL 0,5% y DTT 5 mM), 1,6 μL de Buffer B 10x (HEPES pH7,9 50 mM, KCl 250 mM, MgCl_2 20 mM y Glicerol 38%), 5% Glicerol, DTT 1 mM en un volumen final de 16 μL completado con Buffer hipotónico (HEPES 10 mM pH 7,4, MgAc_2 1,5 mM, KAc 10 mM, DTT 2,5 mM y Glicerol 3%). La mezcla se irradió con luz Ultravioleta (UV) (254 nm, Stratalinker 1800, Stratagene) durante 30 min en hielo, a 10 cm de la lámpara. Seguidamente, se incubó con 16 μg de RNasaA 1 h a 37°C. Finalmente, se añadió tampón de ruptura (Tris-HCl 6 mM pH7,8, Azul de bromo fenol 0,03%, Glicerol 10%, SDS 2%, DTT 0,1 M) a las muestras y se resolvieron en geles de poliácridamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) del porcentaje adecuado al tamaño de la proteína. Las proteínas unidas a las sondas se revelaron mediante autorradiografía de los geles secos.

c) Ensayos de movilidad electroforética de RNA: Los complejos RNA-proteína se formaron incubando la sonda marcada con ^{32}P ($10\text{-}20 \times 10^3$ cpm) con cantidades crecientes de proteína purificada durante 15-20 min en un volumen final de 10 μL en Buffer de retardo (Tris 40 mM pH7,5, NaCl 250 mM, β -Mercaptoetanol 0,1%) a 15-20°C. Transcurrida la incubación, se añadió 1 μL de Buffer Xilencianol (Tris 10 mM pH7,5, Glicerol 48,5%, Xilencianol 0,5%). Los complejos RNA-proteína se separaron mediante electroforesis en geles nativos de poliácridamida (29:1) del 6 o 8% en TBE (Tris 90 mM pH8,4, ácido bórico 69,6 mM, EDTA 2,5 mM) a 100 V y 4°C. La movilidad electroforética del RNA se detectó por autorradiografía de los geles secos.

d) Ensayos de unión RNA-Proteína: Los complejos Ni-NTA/HIS-Gemin5 se obtuvieron incubando resinas de agarosa Ni-NTA (25 μL) con el polipéptido de interés (0,7 pmol) en un volumen de 100 μL de Binding Buffer H (BBH) (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, MgCl_2 2,5 mM, NP-40 0,01%) durante 4 h a 4°C en una noria. Las proteínas no unidas se eliminaron lavando tres veces con BBH frío. Se añadió la sonda (80 fmol) a los complejos proteína-resina y se incubó en presencia de RNA citoplásmico (relación molar 300:1 con la sonda) durante 2 h a 4°C en la noria. El RNA no unido se eliminó lavando 5 veces con BBH frío. Finalmente, el RNA se extrajo con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol y se resolvió en geles desnaturalizantes (acrilamida 6%, urea 7M). La visualización de los RNAs se llevó a cabo por autorradiografía.

5. Traducción *in vitro*

Los RNAs sintetizados *in vitro* se incubaron con RRL al 70% (Promega) en presencia de ^{35}S -metionina (10 μCi) y HEPES 20 mM pH 7,4, KCl 0,1 M, DTT 0,1 M, Glicerol 5% en un volumen final de 10 μL , 1 h a 30°C. Las muestras se trataron con 0,5 μg de RNasa durante 10 min a 15-20°C y se resolvieron en geles SDS-PAGE. Las proteínas sintetizadas se identificaron mediante autorradiografía de los geles secos.

6. Líneas celulares y medios de cultivo

Las líneas celulares HeLa (células humanas de cáncer cérvico-uterino) y HEK293 (células embrionarias de riñón humano) se cultivaron en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), en atmósfera húmeda a 37°C, 7% de CO₂.

a) Transfección mediante lipofectamina: Se sembraron 7x10⁵ células en pocillos de M6, y se transfectaron a una confluencia del 70 %. En un tubo de poliestireno se mezcló 83 µL de Opti-MEM (Invitrogen), el plásmido a transfectar (1µg) y 5 µL de Plus Reagent (Invitrogen). En otro tubo se añadió 83 µL de Opti-MEM y 5 µL de Lipofectamina (Invitrogen). Se mezclaron ambos tubos y se incubó 30 min en cabina. Las células se lavaron dos veces con Opti-MEM, dejando 2 mL por pocillo. Sobre cada pocillo se añadió la mezcla DNA-Lipofectamina, incubándose 3-4 h a 37°C. Pasado ese tiempo, se cambió el medio por DMEM con FBS 10%. Cuando se usó Lipofectamina LTX (Invitrogen), se procedió igual, excepto que no se empleó Opti-MEM.

b) Transfección mediante fosfato de calcio: Sembramos 10⁶ células HEK293 en una placa p60, para transfectar al día siguiente a una confluencia entre 50-70 %. En un tubo de poliestireno se añadió 500 µL de 2X HBS (HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 280 mM, KCl 10 mM, Na₂HPO₄-2H₂O 1,5 mM, Dextrosa 12 mM). En otro tubo, se mezcló el DNA de interés (3-5 µg), DNA de espermatozoos de salmón (hasta 20 µg de cantidad total de DNA) y 60 µL de CaCl₂ 2 M en agua, hasta 500 µL. La mezcla de DNA-CaCl₂ se añadió sobre el tubo de 2X HBS mientras se burbujeó aire. Después de 30 min en cabina se formó un precipitado en el tubo, del que se añadió 300 µL en cada placa p60. Las placas se incubaron durante 16-20 h a 37°C antes de sustituir el medio por DMEM con FBS al 10%.

c) Generación de líneas celulares estables HEK293-MS2-HB: La generación de líneas estables que expresan la proteína MS2-HB constitutivamente se realizó partiendo de 7x10⁶ células HEK293 transfectadas con el plásmido pMS2-HB (Addgene plasmid # 3557, (Tsai et al., 2011)) usando fosfato cálcico. A las 24 h se realizaron diluciones (1/100, 1/50, 1/10 y 1/2) de las células transfectadas. Transcurridas 24 h, se añadió puromicina (3 µg/mL). Después de 1-2 semanas se formaron clones que se fueron expandiendo desde pocillos M48 hasta p60 o p100. Para analizar los clones, se recogieron lisados y se analizaron por Western-Blot (WB) usando el anticuerpo anti-biotina.

d) Interferencia por siRNA: Los RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) contra las proteínas de estudio se diseñaron usando la plataforma de Dharmacon (Tabla 2) (<http://dharmacon.gelifesciences.com/design-center/>). Células HEK293 se sembraron a una confluencia del 70% y se trataron con siRNA (25, 50 o 100 nM) usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante.

e) Actividad del elemento IRES: La actividad IRES se cuantificó como la expresión de luciferasa (LUC) normalizada respecto a la cantidad total de proteína. La actividad cloranfenicol-acetil transferasa (CAT) refleja la traducción dependiente de cap (Fig.8). Transcurridas 24 o 48 h de la transfección con CMVpBIC (Pacheco et al., 2009) se lisaron las células usando 100 µL de Buffer de lisis C (Tris-HCl 50 mM pH 7,8, NaCl 100 mM, NP40 0,5%)

por pocillo de M6. Después de centrifugar 5 min a 16000 g, 4°C, se recogió el sobrenadante. La determinación de la cantidad de proteínas en el lisado se realizó mediante el ensayo de Bradford. En una placa de 96 pocillos de fondo plano se preparó una recta patrón con albúmina de suero bovina (BSA) (1µg/µL), así como las muestras (1 µL de muestra y 11 µL de agua). Se añadió la mezcla de 40 µL del reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein assay dye reagent) con 148 µL de agua por muestra. La D.O a 595 nm se midió en un espectrofotómetro (BioRad).

Tabla 2. siRNAs.

Proteína	siRNA	Secuencia
Control	NC#3	AUGUAUUGGCCUGUAUUAUU
Gemin5	G5.1	GCAUAGUGGUGAUAAUUGAUU
	G5.2	CAAUGAAGAUGGAUCAUAUU
	G5.3	CCUUAUCAAGAAGAGAAAUU
Rab1b	Rab1b.1	GAUCCGAACCAUCGAGCUGUU
ARF5	ARF5.1	UGAGCGAGCUGACUGACAAUU
	ARF5.2	CCACAAUCCUGUACAAACUUU
RPS25	hRPS25.1	GGACUUAUCAAACUGGUUUUU
CUGBP1	CUGBP1.1	AGCCAAACUGUUCUAUUAUU
	CUGBP1.2	GGCUUAAAGUGCAGCUCAAUU
SYNCRIP	SYNCRIP.1	CUAUCGUGGUGGAUAUGAAUU
UPF1	UPF1.1	AGACAGUCCUGGAGUGCUAUU
	UPF1.2	GAUGCAGUCCGCUCCAUUUU

Para medir la actividad de la luciferasa se cuantificó la luz emitida por la proteína en presencia de luciferina usando un luminómetro (Siruis, Berthold). Se mezcló una cantidad del extracto (10-20 µg) con 200 µL Buffer de luciferasa (Glycil-Glicina 25 mM, MgSO₄ 15 mM, ATP 5 mM, BSA 0,1 mg/mL, DTT 1mM); se inyectó 100 µL de luciferina (Promega) y se midió la emisión de fotones durante 10 seg (RLU).

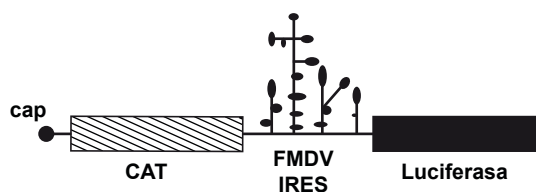


Figura 8. Representación esquemática del RNA bicistrónico.

La actividad CAT se midió a través de la capacidad del lisado de acetilar cloranfenicol, en presencia de Tris-HCl 0,1 M pH 7,8, cloranfenicol 2mM, AcCoA 10 mM y AcCoA-³H (5 µCi) durante 2 h a 37°C. La reacción se detuvo añadiendo 80 mM de borato sódico pH 9, 4 M NaCl. Los productos acetilados se separaron con 1 ml de líquido de centelleo para muestras orgánicas.

La actividad IRES se determinó en tres ensayos independientes, representando la media ±SD.

7. Inmunodetección

Después de resolver las proteínas mediante geles SDS-PAGE, se transfirieron a membranas Immuno-Blot PVDF, 0,2 μm (BioRad) usando un equipo Trans-Blot Turbo (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas se analizaron mediante western-blot (WB). Los anticuerpos primarios fueron: anti-Gemin5 (Novus), anti-Xpress (Invitrogen), anti-ARF5 (Abnova), anti-RPS25 (ProteinTech), Streptavidin-HRP (Thermo Scientific), anti-hUPF1 (Abcam), anti-Rab1b, anti-SYNCRIP y anti-CUGBP1 (Santa Cruz Biotech), Tubulina (Sigma), con los anticuerpos secundarios apropiados para cada uno de ellos (Thermo Scientific).

8. Preparación de extractos celulares S10

Células HeLa (10×10^6) sembradas en placas de p100 se lavaron dos veces con PBS frío y se añadió 2 ml de PBS/p100. Se recogieron las células con el barredor en un tubo Falcon de 15 ml a 4°C. Se centrifugó 3 min a 870 g, 4°C, eliminando el sobrenadante. Se añadió 1 volumen (p/v) de Buffer hipotónico y se resuspendió el sedimento. Las células se lisaron con el homogenizador Douncer en hielo (30 golpes). El lisado se transfirió a un tubo eppendorf, se centrifugó 5 min a 2300 g, 4°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar 5 min a 9300 g, 4°C, conservando el sobrenadante resultante Buffer hipotónico suplementado con glicerol (3% final).

9. Extracción de RNA de células

Células HeLa (10×10^6) sembradas en placas p100 se lavaron dos veces con PBS frío antes de lisar las células con 500 μL /p100 de Buffer de lisis C. El lisado se centrifugó 5 min a 16000 g, 4°C; el sobrenadante se dividió en dos tubos de 2 ml a los que se añadió 1 ml de TRIzol Reagent (Life Technologies). Se agitaron en el vórtex durante 30 seg, antes de añadir 250 μL de Cloroformo:Isoamílico (24:1) y agitar de nuevo 30 seg. Después de centrifugar 5 min a 13400 g, 4°C se recogió la fase acuosa y se precipitó con 1 volumen de isopropanol frío a -20°C, 30 min. Se centrifugó 15 min a 16000 g, 4°C; se lavó con 1 mL de etanol al 70% frío, y se resuspendió en TE.

10. Identificación de proteínas que interaccionan con subdominios estructurales del IRES

a) Purificación de RNA quimera: Las bacterias transformadas con los plásmidos pBSMrnaStrep/D3, Bucle C, SL3abc y SL3a se inocularon en 4 mL de medio LB con Kanamicina. Al día siguiente se centrifugaron 10 min a 4000g, 4°C, se resuspendió el sedimento en Tris 50 mM pH 7,5, 180 μL volumen final de. Se añadió 200 μL de fenol, se agitó 20-30 seg a 15-20°C y se centrifugó 10 min a 10000 g. Se recogió la fase acuosa, el RNA se precipitó con 0,1 volúmenes de 5 M NaCl, 2 volúmenes de Etanol 100% frío y se resuspendió en 100 μL de agua libre de RNasas. La cantidad e integridad del RNA obtenido se analizó en geles de acrilamida-bis acrilamida 8%, urea 8 M, 35 min a 300 V.

b) Extracción de proteínas asociadas a RNA quimera: Los RNAs quimera (20 pmol) se asociaron a 100 μ L de bolas magnéticas recubiertas de estreptavidina (10 mg/mL) (Dyna-beads M-280 (Invitrogen)), previamente lavadas con 500 μ L de Binding&Washing Buffer (Tris-HCl 5 mM pH7,5, EDTA 0,5 mM, NaCl 1 M). Cada lavado se realizó incubando en la noria 5 min a 15-20°C, seguido de 2 min en la gradilla magnética. Después se lavó dos veces con 600 μ L de Solución A (NaOH 0,1 M, NaCl 50 mM) y una vez con solución B (NaCl 10 mM), finalmente se resuspendieron las bolas magnéticas en 100 μ L de Solución B. Se añadió el RNA quimera (20 pmol), 100 μ L de Buffer de plegamiento (HEPES 100 mM pH7,4, MgCl₂ 6 mM, NaCl 200 mM) en agua hasta un volumen final de 500 μ L y se incubó 30 min en la noria a 15-20°C. Se acercó 3 min al imán, se retiró el sobrenadante y se lavó tres veces con Buffer de plegamiento. Se resuspendió en 50 μ L de Buffer de plegamiento 5X y se añadió 25 μ L de BSA (10mg/ml), agua hasta 250 μ L y se incubó 15 min en la noria a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con Buffer de plegamiento 1X. El sedimento se resuspendió en una disolución compuesta de 10 μ L de Buffer de plegamiento 5X, 100 μ g de extracto celular S10, tRNA de levadura (2 nM), DTT 1 mM, 1 μ L de Buffer Dyna (HEPES 100 mM pH7,4, MgCl₂ 0,45 mM, NaCl 100 mM) y agua hasta un volumen final de 50 μ L y se incubó 30 min en noria a 15-20°C. Después de lavar tres veces con Buffer de plegamiento, se añadió 25 μ L de tampón de ruptura y se calentó 5 min a 95°C. Los RNAs se separan de las proteínas eluidas que posteriormente se analizaron en geles SDS-PAGE teñidos con plata, y espectrometría de masas (MS).

Para la tinción con plata, los geles SDS-PAGE se incubaron 2 h en 50 mL de solución de fijación (Etanol 50%, ácido acético 12%, formaldehído 0,00185%) y se lavaron tres veces durante 20 min con etanol 50%. Después se añadió 50 mL de solución sensibilizante (Na₂S₂O₃-5H₂O 0,02%) durante 1 min y se realizaron dos lavados de 30 seg con agua, para luego incubar durante 20 min con 50 mL de solución de plata (AgNO₃ 0,2%, formaldehído 0,028%) y lavar dos veces con agua. Finalmente se añadió sobre los geles 50 mL de solución de revelado (K₂CO₃ 3%, Na₂S₂O₃-5H₂O 0,0004%, formaldehído 0,0185%) con agitación. La reacción se detuvo añadiendo solución de parada (Glicina 1%).

11. Marcaje de células con isotopos estables de aminoácidos (SILAC)

SILAC es una técnica de proteómica cuantitativa que permite analizar cambios en el proteoma comparando niveles de proteínas entre estados celulares distintos (Ong et al., 2002). En esta metodología se aprovecha los aminoácidos esenciales de las células para sustituirlos por aminoácidos marcados con isótopos pesados estables en una de las situaciones de análisis. Tras una serie de duplicaciones celulares, se mezclan los lisados celulares marcados con isótopos ligeros o pesados antes del análisis de espectrometría de masas, permitiendo detectar péptidos pesados o ligeros de las proteínas por desplazamiento de sus picos.

La técnica incluye varias etapas: marcaje isotópico de las células a estudiar, obtención de los lisados celulares, digestión con tripsina para la obtención de los espectros MS y MS/MS y, finalmente, análisis de los datos obtenidos mediante técnicas bioinformáticas.

a) Marcaje de células HEK293-MS2-HB con isótopos pesados estables: Las líneas celulares estables HEK293-MS2-HB se cultivaron en medio DMEM suplementado con $^{12}\text{C}_6^{14}\text{N}_4$ -Arg (28 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y $^{12}\text{C}_6^{14}\text{N}_2$ -Lys (73 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma) para las condiciones de medio ligero. Para el marcaje con medio pesado se usó $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ -Arg y $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -Lys (Cambridge Isotope Laboratories) en la misma concentración que los isótopos ligeros durante, al menos, siete duplicaciones para garantizar un marcaje completo de las proteínas. En ambas condiciones se empleó suero dializado al 10 % (Cambridge Isotope Laboratories) y puromicina (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

b) Purificación de proteínas asociadas a los RNA etiquetados con las horquillas que reconoce la proteína MS2: Monocapas confluentes de células HEK293-MS2-HB, cultivadas en las condiciones de medio pesado o ligero, se transfectaron con el plásmido pIRES-luc o CAP-luc, respectivamente. 24 h después se lavaron dos veces con 4 mL de PBS, sin retirar el segundo lavado, se irradiaron con luz ultravioleta (400 mJ/cm^2). Se retiró el PBS y se añadió 900 μL de Buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, KCl 100 mM, MgCl_2 5 mM, NP-40 0,5%, DTT 10 mM, inhibidores de proteasa, RNase out 0,5 U/ μL). Se incubó 10 min en hielo antes de centrifugar el lisado 15 min a 16000 g, 4°C, recogiendo el sobrenadante. La concentración total de proteína se determinó por Bradford.

Las bolas magnéticas recubiertas de estreptavidina (20 μL por muestra) se lavaron con Binding&Washing buffer seguido de 3 veces con Buffer de lisis. Finalmente, se resuspendieron en 20 μL de PBS, añadiendo 500 μg de proteínas del lisado de HEK293-MS2-HB transfectado con pIRES-Luc o pCAP-Luc, llevando el volumen final a 100 μL con Buffer de lisis. Se incubó 30 min en la noria a 4°C antes de incubarlo 5 min en la gradilla magnética y retirar el sobrenadante; se lavó 3 veces con Buffer de lisis. Finalmente, se añadió 30 μL de tampón de ruptura 3X y se calentó 5 min a 95°C para separar las proteínas del RNA etiquetado con las horquillas reconocidas por la proteína MS2. Las proteínas eluidas se analizaron en geles SDS-PAGE o analizarse mediante espectrometría de masas.

12. Espectrometría de masas

a) Análisis proteómico mediante LTQ-Orbitrap-Velos-Pro: Las muestras de proteínas asociadas a los subdominios del IRES se cargaron en pocillos de 1,2 cm de geles SDS-PAGE. La electroforesis se detuvo cuando el frente entra 3 mm en el gel separador para concentrar el proteoma en la interfase concentrador-separador. Las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con Coomassie y se extrajeron cortando fracciones de 2x2mm. Estas bandas se digirieron *in situ* con tripsina (60 ng/ μL) (Shevchenko et al., 1996), usando una proporción proteína: tripsina 5:1 durante 2 h en hielo seguido de 12 h a 37°C. La digestión se detuvo añadiendo ácido trifluoroacético 1%. El sobrenadante se secó y se desaló mediante puntas de pipeta OMIX C18 para su posterior análisis por espectrometría de masas.

Los péptidos resultantes de la digestión se resuspendieron en 10 μL de ácido fórmico 0,1% y se analizaron mediante RP-LC-MS/MS en un sistema Easy-nLCII acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica LTQ-Orbitrap-Velos-Pro (Thermo-Scientific). Los péptidos se concentraron mediante cromatografía en fase reversa usando pre columnas

C18 RP de 0,1 mm x 20 mm (Proxeon), y se separaron usando una columna C18 RP de 0,075 mm x 100 mm, a 0,3 μ L/min. Los péptidos se eluyeron usando un gradiente de 120 min, de 5%-40% de solvente B (Solvente A: ácido fórmico 0,1% en agua, Solvente B ácido fórmico 0,1%, acetonitrilo 80% en agua). La ionización se realiza mediante una interfaz de emisores de nano poros de acero inoxidable ID 30 μ M (Proxeon).

Los péptidos se detectaron mediante escáneres de superficie desde 400 a 1600 amu (1 μ s-can), seguido de 20 datos dependientes de los escáneres de MS/MS, usando un aislamiento de una anchura de 2 u (unidades de relación carga-masa), una energía de colisión normalizada del 35% y una dinámica de exclusión aplicada durante periodos de 30 seg. La identificación de los péptidos a partir de los datos crudos se llevó a cabo mediante el algoritmo SEQUEST (Proteome Discovered 1.3, ThermoScientific). La búsqueda en base de datos se realizó contra Uniprot-homo.fasta. Se aplicaron los siguientes criterios de restricción: corte triptico tras Arginina y Lisina, hasta dos sitios de corte inactivos y una tolerancia de 10 ppm de los precursores iónicos y de 0,8 Da para los fragmentos MS/MS. La búsqueda se realizó permitiendo oxidaciones de metionina y carbamidometilaciones de cisteína. Se aplicó una proporción de falsos positivos (FDR) < 0,01.

b) Análisis mediante LC-ESI-MS/MS: Para cada mezcla de purificación del ensayo de SILAC se recogieron 6-8 bandas separadas en geles SDS-PAGE que se digirieron con tripsina usando un robot digestor Bruker Proteineer, de acuerdo al protocolo descrito anteriormente (Shevchenko et al., 1996). La alquilación se llevó a cabo con IAA 55 mM a temperatura ambiente antes de añadir tripsina (0,1 μ g, Sigma-Aldrich). La digestión se realizó a 37°C durante 18 h. Tras la digestión, los péptidos se extrajeron, concentraron y secaron mediante centrifugación en vacío y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Se realizó un análisis de nano LC-ESI-MS/MS usando un Eksigent 1D-nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masas 5600TripleTOF QTOF (ABSciex, Framingham, MA, USA). Se usó una columna de análisis en fase reversa basada en silicio (Waters nanoACQUITY UPLC 75 μ m x 15 cm) con un tamaño de partícula de 17 μ m. La columna trampa (chromXP, diámetro de partícula de 3 μ m y poro de 120 Å), se conectó en serie con la columna analítica. La bomba de carga liberaba una solución de 0,1% de ácido trifluoroacético en 98% de agua/2% acetonitrilo (Scharlab, España) con un flujo de 3 μ L/min. La nano bomba obtuvo un flujo de 250 nL/min, en condiciones de gradiente de elución, usando 0,1% de ácido fórmico (Fluka, Buchs, Suiza) en agua como fase móvil A, y 0,1% de ácido fórmico en 80% acetonitrilo/20% agua como fase móvil B. El gradiente de elución se realizó acorde al siguiente esquema: condiciones isocráticas de 96% A: 4% B durante 5 min, un incremento lineal hasta 30% de B en 110 min, un incremento de B hasta 40% en 10 min, un incremento lineal de B hasta 95% en 5 min, condiciones isocráticas de 95% de B en 5 min y un retorno a las condiciones iniciales en 10 min. El volumen de inyección fue de 5 μ L. El sistema LC se acopló al espectrómetro de masas a través de una fuente nanospray. La adquisición automática de datos mediante exclusión dinámica permitió un escaneo completo del espectro MS (m/z 350-1250) seguido de un espectro en tándem MS CID de los 10 iones más abundantes. El tiempo de adquisición fue de 250 ms y 100 ms para el espectro MS y MS/MS respectivamente.

El espectro MS/MS se exportó a un formato mgf usando el programa Peak View v1.2.0.3 u y se buscó a través del servidor Mascot 2.5.1, OMSSA 2.1.9, X!TANDEM 2013.02.01.1 con el plug-in de k-score para X!TANDEM y Myrimatch 2.2.140 contra una base de datos compuesta por target/decoy construida con las secuencias de referencia para el proteoma de *Homo sapiens* de la base de Uniprot Knowledgebase (Octubre 2013), junto con una base construida con la proteína MS2-HB, utilizada como anzuelo para purificar las proteínas asociadas a los RNAs, y las contaminaciones más frecuentes, como las queratinas.

El motor de búsqueda se configuró para marcar candidatos potenciales con una tolerancia de error de masa de 25 ppm, una tolerancia de fragmentos iónicos de 0,02 Da, permitiendo un máximo de dos sitios de digestión tripticos ignorados y un error de isótopo máximo (^{13}C) de uno. Se consideraron las carbamidometilaciones como modificaciones fijas, mientras que se consideraron como variables las oxidaciones de metionina, la presencia de ácido piroglutámico procedente de glutamina o ácido glutámico presente en el N-terminal, la acetilación de proteínas en el N-terminal y las marcas del SILAC en los residuos de arginina y lisina.

Se usaron modelos de distribución de la puntuación para computar las coincidencias entre péptido y espectro (Ramos-Fernandez et al., 2008). Los espectros que se recuperaron con un valor de FDR<0,01 se seleccionaron para el análisis cuantitativo. Tras eliminar las señales de baja calidad, se determinó la presencia diferencial de polipéptidos de cada proteína usando modelos lineales (Lopez-Serra et al., 2014).

La significación estadística se determinó usando q-values (FDR). Todos los análisis de espectrometría de masas se realizaron usando el software de Proteobotics (Madrid, España).

13. Análisis informático de las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas

a) PANTHER: La clasificación funcional de las proteínas identificadas se llevó a cabo usando versión 11 de la plataforma informática PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) (Mi et al., 2017). De las utilidades que ofrece el sistema se empleó la de clases de proteínas, basado en una clasificación de las proteínas por Gene Ontology (GO) (Consortium, 2017; Mi et al., 2013) para agrupar las proteínas purificadas.

b) Cytoscape/BinGO: Las redes de interacciones se generaron usando la aplicación BinGO (Maere et al., 2005) de la plataforma Cytoscape (Shannon et al., 2003). Los nudos que componen las redes corresponden a proteínas relacionadas por GO en función del proceso celular. El tamaño de los nudos representa el número de proteínas que lo componen, mientras que el color de los mismos hace referencia a la significatividad estadística (p-value) de cada nudo. La significatividad estadística de las redes de interacciones se calcularon como la significatividad media de los nudos que componen cada red. Para el análisis se aplicó una corrección de FDR de 0,01 y el valor de significatividad reflejado en cada figura.



RESULTADOS



1. Sitios de unión a RNA no canónicos en Gemin5 implicados en la iniciación interna de la traducción

Gemin5 es una proteína predominantemente citosólica con capacidad de unir a RNA que se describió por primera vez como componente periférico del complejo SMN (Otter et al., 2007); es la proteína encargada de la unión a los snRNAs para el ensamblaje de los snRNPs responsables del splicing (Battle et al., 2006; Yong et al., 2010). El reconocimiento de los snRNAs tiene lugar a través de su región N-terminal, donde se localizan los motivos repetidos WD (Jin et al., 2016; Xu et al., 2016).

Nuestro laboratorio determinó que Gemin5 interacciona con el IRES de dos virus distintos, FMDV y HCV, regulando negativamente su traducción (Pacheco et al., 2009). La interacción entre Gemin5 y el IRES de FMDV ocurre en el dominio 5 del IRES compitiendo por la unión de PTB a esta región (Pineiro et al., 2013). Mientras que el reconocimiento de los snRNAs por Gemin5 implica las repeticiones WD, la región responsable de la unión de Gemin5 al IRES se localiza dentro del extremo C-terminal. Durante la infección por FMDV numerosas proteínas son proteolizadas por las proteasas virales. Gemin5 es sustrato de la proteasa L, generando dos fragmentos detectables, p85 y p57 (Pineiro et al., 2012).

Todos estos datos nos llevaron a tratar de identificar con precisión la región de Gemin5 tanto implicada en la interacción con el IRES de FMDV así como en la regulación negativa de la traducción mediada por IRES.

1.1. La interacción de Gemin5 con el elemento IRES implica un sitio bipartito localizado en la región C-terminal

Datos previos del laboratorio habían determinado que Gemin5 era capaz de unirse directamente al dominio 5 del elemento IRES de FMDV (Pineiro et al., 2013). Con el objeto de identificar la región concreta de la proteína responsable de la interacción con este dominio del IRES se prepararon construcciones que expresaban polipéptidos correspondientes a distintas regiones de Gemin5 (Fig.9A). Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos de cross-link mediante luz UV con cantidades crecientes de los polipéptidos purificados y el dominio 5 del IRES como sonda. La región N-terminal (aminoácidos 1-1208) de la proteína, que contiene las repeticiones WD, dio resultado negativo, de acuerdo a datos previos (Fig.9B) (Pineiro et al., 2013). La incubación del polipéptido G5₈₄₅₋₁₅₀₈ con la sonda dominio 5 dio lugar a un producto de 85 kDa, semejante al polipéptido purificado detectado mediante WB (Fig.9B).

Para analizar con precisión el dominio de unión a RNA de Gemin5 dividimos la región C-terminal, comprendida entre los aminoácidos 1287-1508, en dos productos. La proteína G5₁₂₉₇₋₁₄₁₂ dio lugar a un producto muy intenso, con movilidad similar a la detectada en el gel teñido con azul Coomassie del péptido purificado (Fig.9B). De la misma manera, cuando se realizó el ensayo con el fragmento 1383-1508 se observó una banda con una movilidad de 22 kDa, coincidente con la observada en el WB del polipéptido purificado (Fig.9B).

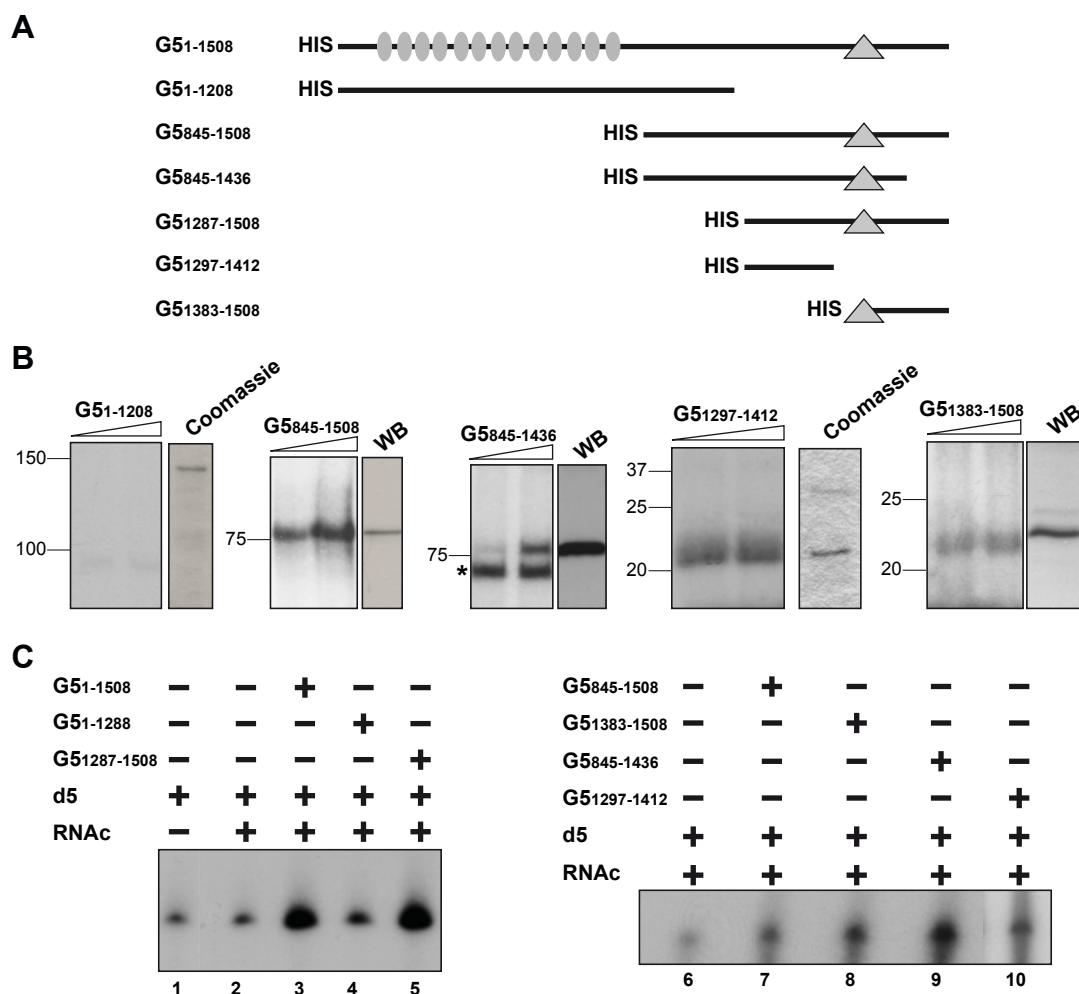


Figura 9. Identificación del sitio de unión al IRES de Gemin5. (A) Esquema de los polipéptidos etiquetados con histidina (HIS) usados en los ensayos de unión a RNA. Los números indican los aminoácidos, referidos a la proteína completa. Los óvalos grises representan los motivos WD de la región N-terminal de la proteína. El triángulo de la región C-terminal de la proteína simboliza la posición del epítipo reconocido por el anticuerpo contra Gemin5. (B) Autorradiografía del ensayo de crosslink por luz UV realizado con cantidades crecientes de los polipéptidos purificados indicados en la parte superior y la sonda del dominio 5, resueltos en SDS-PAGE. La movilidad de la proteína detectada mediante WB usando anti-Gemin5 o tinción con azul de Coomassie se muestra a la derecha. La movilidad de los marcadores de peso molecular se muestra a la izquierda. (C) Ensayos de unión Gemin5-RNA. Autorradiografías de geles desnaturalizantes (acrilamida 6%, 7M urea) cargados con RNAs aislados de resinas de Ni-agarosa acoplados a las proteínas indicadas (0,07 pmol). D5 y RNAc indican la sonda marcada dominio 5 y el RNA citoplásmico total, respectivamente.

Con estos datos concluimos que la proteína Gemin5 contiene un sitio bipartito de unión a RNA, comprendido entre los residuos 1297-1412 y 1383-1508, que denominaremos en adelante RBS1 y RBS2, respectivamente. Estos sitios son responsables de la interacción directa de Gemin5 con el dominio 5 del IRES de FMDV.

Para determinar la eficiencia de interacción con el RNA usamos las proteínas purificadas en ensayos de afinidad a RNA aprovechado la presencia de una etiqueta de 6 Histidinas en su extremo N-terminal. La proteína completa (1-1508) y las dos mitades que la componen,

G5₁₋₁₂₈₈ y G5₁₂₈₇₋₁₅₀₈, previamente inmovilizadas en resinas de Ni-agarosa, se incubaron con el RNA del dominio 5 marcado uniformemente con P³². Tras una serie de lavados, se eluyó el RNA unido para analizarlo mediante electroforesis en geles desnaturalizantes (Fig.9C, líneas 3, 4 y 5). La movilidad del RNA eluido en cada una de las reacciones fue igual que la de la sonda libre (Fig.9C, línea 1), indicando ausencia de RNasas en el ensayo. El control negativo, que consistió en el RNA incubado con la resina de Ni-agarosa en ausencia de proteínas, se usó para determinar el fondo del ensayo (línea 2). La capacidad de unir RNA de la región C-terminal, G5₁₂₈₇₋₁₅₀₈ (línea 5), fue similar a la de la proteína completa (G5₁₋₁₅₀₈, línea 3) y, a su vez, superior a la observada para la región N-terminal (G5₁₋₁₂₈₈, línea 4). Además, los polipéptidos G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈ y G5₁₂₉₇₋₁₄₁₂ (Fig.9C, panel derecho, líneas 8 y 10, respectivamente) mostraron una capacidad de unir RNA por encima de la señal del fondo (línea 6), de la misma manera que ocurre con los polipéptidos que los contienen, como G5₈₄₅₋₁₅₀₈ y G5₈₄₅₋₁₄₃₆ (líneas 7 y 9).

Estos datos van en la misma línea que los obtenidos en los ensayos de crosslink por luz UV, reforzando la conclusión sobre la existencia de un sitio bipartito compuesto por los aminoácidos 1297-1412 (RBS1) y 1383-1508 (RBS2) en la región C-terminal de Gemin5, necesario y suficiente para interactuar con el IRES de FMDV.

1.2. Deleciones en la zona N-terminal de RBS1 disminuyen su capacidad de unión

La capacidad de unir RNA de G5₁₂₉₇₋₁₄₁₂ (Fig.9B) nos animó a definir los límites del dominio RBS1 mediante pequeñas deleciones de aminoácidos en su extremo N-terminal en ensayos de retardo en gel. Como se observa en la Fig.10A, el polipéptido G5₁₂₉₇₋₁₅₀₈ mostró la mayor capacidad de unir RNA ($K_d \approx 20 \mu M$), mientras que las proteínas con deleciones de 10 y 43 aminoácidos (G5₁₃₀₇₋₁₄₁₂ y G5₁₃₄₀₋₁₄₁₂) sufrieron una pérdida drástica de capacidad de unión a RNA ($K_d \approx 350 \mu M$). Estos resultados sugieren que el dominio RBS1 completo (Fig.10B, resaltado en azul), que contiene dos residuos de Ser en su región N-terminal, es importante para la unión a RNA. En base a estos datos, intentamos generar un modelo tridimensional del polipéptido 1297-1412 mediante resonancia magnética nuclear (NMR). Los resultados obtenidos indicaron la ausencia de una estructura terciaria única (Fig.10C). Solo el 80% de las señales correspondientes al dominio RBS1 estaban definidas en el espectro, impidiendo el asignamiento único de las resonancias. A pesar de todo, se asignaron algunos fragmentos de la secuencia usando esqueletos estándar de experimentos de triple resonancia. Basándonos en estas asignaciones y en la dispersión mostrada por las señales de NMR, sugerimos que la construcción RBS1 tiene una pequeña conformación helicoidal, entre los aminoácidos 1355-1367 (H_A), rodeada de regiones no estructuradas (Fig.10B), produciendo el conjunto de conformaciones flexibles observadas en los ensayos NOESY (Nuclear Overhauser effect spectroscopy) en 2D y 3D.

Por otra parte, según los modelos de predicción de estructura secundaria, la región C-terminal de Gemin5 (RBS2) (Fig.10B, resaltado en marrón) está compuesta por cuatro hélices (H1 a H4), de las que la segunda (H2) y la tercera (H3) están enriquecidas en Leu y Gln, respectivamente.

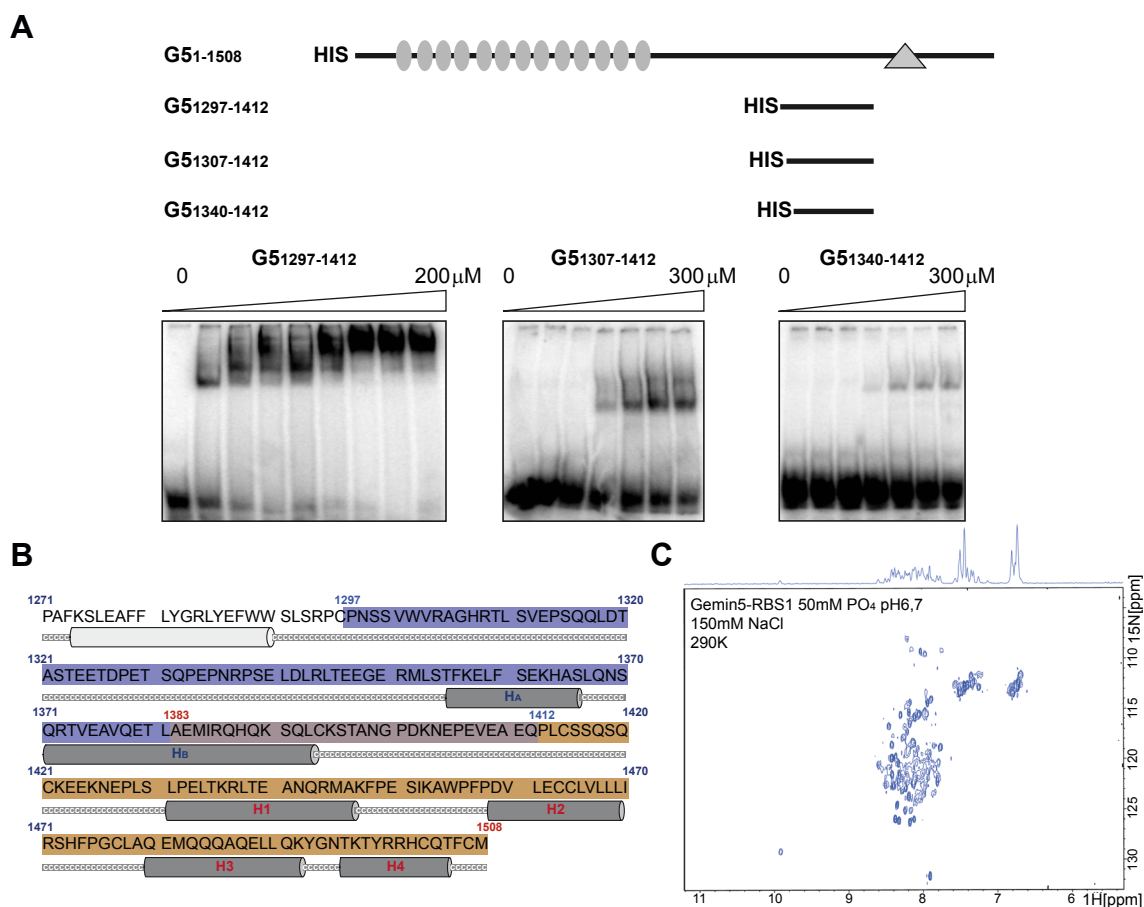


Figura 10. Determinación de la capacidad de unir RNA de Gemin5. (A) Autorradiografías de ensayos de retardo en gel realizados con cantidades crecientes de los polipéptidos purificados de Gemin5 indicados en la parte superior y sonda RNA dominio 5 marcada uniformemente, resueltos en geles nativos. (B) Predicción estructural de la región C-terminal de Gemin5. Se usó el programa Jpred3 (Versión Jnet 2.2, www.compbio.dundee.ac.uk) para la predicción de estructura secundaria. Las predicciones de hélices con puntuación inferior a 7 se muestran en gris claro y las puntuaciones entre 8 y 9 en gris oscuro. Valores altos representan una mayor probabilidad de adoptar la conformación helicoidal. Las regiones en bobina enrollada se muestran como una línea gris (C en blanco). Las cajas marrón y azul representan los límites de las dos regiones analizadas, la caja morada indica la región de secuencia solapante. (C) Espectro HSQC del dominio RBS1 de Gemin5 marcado con ^1H - ^{15}N (azul) en buffer fosfato 50 mM con NaCl 150 mM, pH 6,7, adquirido en un espectrómetro de 600 MHz.

1.3. La expresión de formas truncadas de Gemin5 en células de mamífero revela diferencias en la proteína acumulada

Con el objetivo de identificar la región de Gemin5 responsable de regular la traducción en eucariotas, generamos construcciones para expresar polipéptidos parcialmente solapantes en células de mamífero (Fig.11A). Los niveles de expresión de los polipéptidos a distintos tiempos post-transfección fueron monitorizados mediante inmunodetección con anticuerpos contra Gemin5 o contra la etiqueta Xpress, presente en su extremo N-terminal. La inmunodetección de tubulina sirvió para verificar que la cantidad de proteína total cargada por carril estuviera equilibrada.

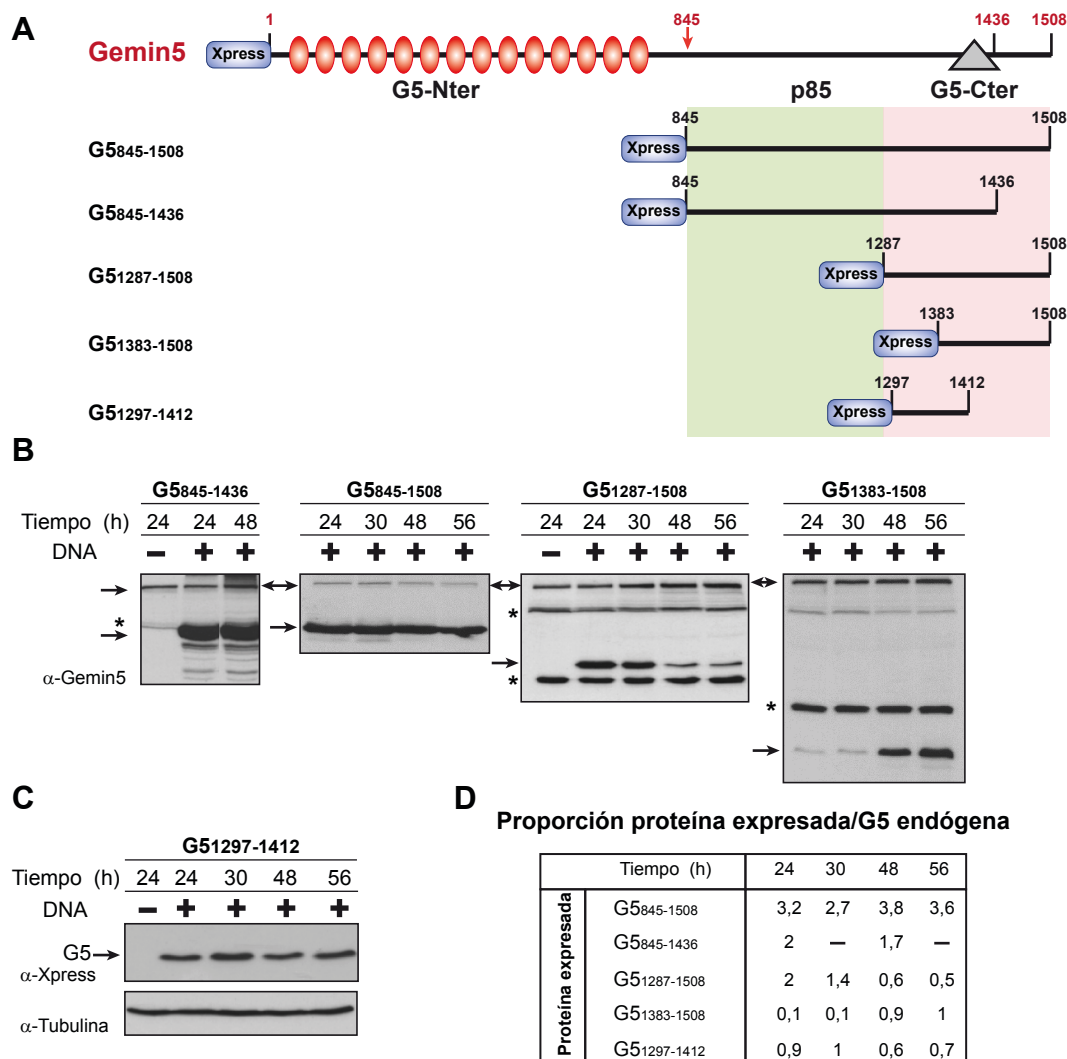


Figura 11. (A) Esquema de los polipéptidos de Gemin5 expresados en células transfectadas. Los números indican aminoácidos referenciados en el texto. La caja azul indica la etiqueta Xpress del extremo N-terminal de los polipéptidos. Los óvalos rojos representan los motivos WD. El triángulo en la región C-terminal indica la posición del epítipo reconocido por el anticuerpo contra Gemin5. **(B) Análisis del tiempo óptimo de expresión de los polipéptidos de Gemin5.** Los plásmidos que expresan las proteínas indicadas se transfectaron en células HEK293; las células transfectadas (+) o control (-) fueron recogidas a los tiempos indicados (h) en tampón de lisis. Se cargaron cantidades iguales de proteína en SDS-PAGE y se revelaron con el anticuerpo anti-Gemin5. Las flechas indican la posición de la proteína Gemin5 (G5), así como la proteína expresada. Los asteriscos señalan productos inespecíficos. **(C) Expresión de G5₁₂₉₇₋₁₄₁₂** determinada mediante WB con el anticuerpo anti-Xpress; para el control de carga se utilizó el anticuerpo anti-tubulina. **(D) Niveles de expresión de los polipéptidos de Gemin5 respecto a proteína endógena,** detectadas mediante WB en la misma membrana usando el anticuerpo anti-Gemin5. Para G5₁₂₉₇₋₁₄₁₂ (que no contiene el epítipo de Gemin5) la intensidad detectada con anti-Xpress se normalizó con la intensidad observada en un experimento paralelo con G5₁₂₈₇₋₁₅₀₈ revelado en la misma membrana.

Los resultados obtenidos indican que existe una acumulación diferencial en el tiempo de los polipéptidos expresados (Fig.11B). Por lo tanto, necesitan distintos tiempos de expresión para poder trabajar con cantidades similares de cada uno de los fragmentos de Gemin5. Por ejemplo, la expresión y acumulación de G5₈₄₅₋₁₅₀₈ y G5₈₄₅₋₁₄₃₆ en células HEK293

fue muy eficiente desde 24 h post-transfección (hpt) y se mantuvo estable hasta 48 hpt (Fig.11B). En esas mismas condiciones, la expresión de G5₁₂₈₇₋₁₅₀₈ resultó óptima a partir de 30 hpt, pero decayó a 48-56 hpt. Sorprendentemente, cuando dividimos G5₁₂₈₇₋₁₅₀₈ en dos fragmentos, G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈ solo se detectó a partir de 48-56 hpt (Fig.11B), mientras que G5₁₂₉₇₋₁₄₁₂ mostró una expresión uniforme desde 24 a 56 hpt (Fig.11C).

La proporción de proteína expresada respecto a la proteína Gemin5 endógena (usando el mismo anticuerpo en la misma muestra) fue de 2 veces en el caso de G5₈₄₅₋₁₅₀₈, G5₈₄₅₋₁₄₁₂ y G5₁₂₈₇₋₁₅₀₈. Sin embargo, en el caso de G5₁₂₉₇₋₁₄₁₂ fue 1 a 30 hpt, mientras que para G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈ se necesitaron 48 hpt para llegar a valores similares a los de la proteína endógena (Fig.11D). Por lo tanto, el tiempo post-transfección necesario para acumular niveles similares de proteína expresada varía en función de la región de Gemin5 que se vaya a estudiar.

1.4. El dominio RBS2 de Gemin5 se comporta como un represor de la traducción

Para determinar la influencia de los fragmentos de Gemin5 en el control de la traducción diseñamos tres siRNAs para deplecionar Gemin5 en células HEK293. De todos ellos, siG5.3 fue el más eficiente a las 48 hpt, manteniendo el efecto hasta las 72 hpt. Comparando el resultado obtenido con un siRNA control, la cantidad de Gemin5 detectada por WB se redujo un 90% (Fig.12A).

El efecto de la depleción de Gemin5 en la eficiencia de traducción se analizó con la construcción CMVpBIC, que permite la síntesis de un transcrito bicistrónico, en el que la actividad de la proteína Luciferasa refleja la traducción dependiente de IRES, mientras que la actividad de la proteína CAT refleja el inicio de la traducción dependiente de cap. La expresión de luciferasa en células deplecionadas de Gemin5, normalizada con la actividad observada en células transfectadas con el siRNA control, indicó que el silenciamiento de Gemin5 produce un incremento de la traducción dependiente de IRES, como muestra la actividad Luciferasa (Fig.12B). Estos datos coinciden con experimentos anteriores realizados usando shRNAs contra distintas secuencias del mRNA de Gemin5 (Pacheco et al., 2009). Además, la sobreexpresión de la proteína completa en las células deplecionadas de Gemin5 mostró una recuperación de la capacidad de inhibir la traducción dependiente de IRES (Fig.12C), confirmando que Gemin5 es un represor de la misma.

La expresión de los polipéptidos de Gemin5 en células silenciadas se usó para estudiar el efecto de las regiones del extremo C-terminal de la proteína en la traducción (Fig.13A). La depleción de Gemin5 se monitorizó por inmunodetección en la misma membrana que se usó para comprobar la expresión del polipéptido estudiado (Fig.13B y D), usando un anticuerpo contra Gemin5, excepto para G5₁₂₉₇₋₁₄₁₂, que se detectó mediante el anticuerpo contra Xpress (Fig.13C). En todos los casos, se usó un anticuerpo contra tubulina como control de carga (Fig.13B, C y D). El efecto sobre la eficiencia de la traducción se midió a través de la expresión de CAT (cap-dependiente) y LUC (IRES-dependiente) del plásmido CMVpBIC. La traducción IRES-dependiente se normalizó con los niveles de LUC observados en las células tratadas con el siRNA control (marcado como 100%) (columnas blancas de las Fig. 13B, C y D).

La depleción de Gemin5 provocó un incremento de la traducción IRES-dependiente de 1,5 veces (columnas negras de las Fig.13B, C), similar a los datos de la Fig.12C. La expresión de G5₁₂₈₇₋₁₅₀₈ afectó a la traducción dirigida por IRES de forma dependiente de dosis, comportándose como un estimulador (Fig.13B). Sin embargo, la expresión de G5₁₂₉₇₋₁₄₁₂ (RBS1), no alteró los niveles de traducción IRES-dependiente (Fig.13C). Ninguno de estos fragmentos mostró el efecto represor observado en la proteína completa (Fig.12B, C).

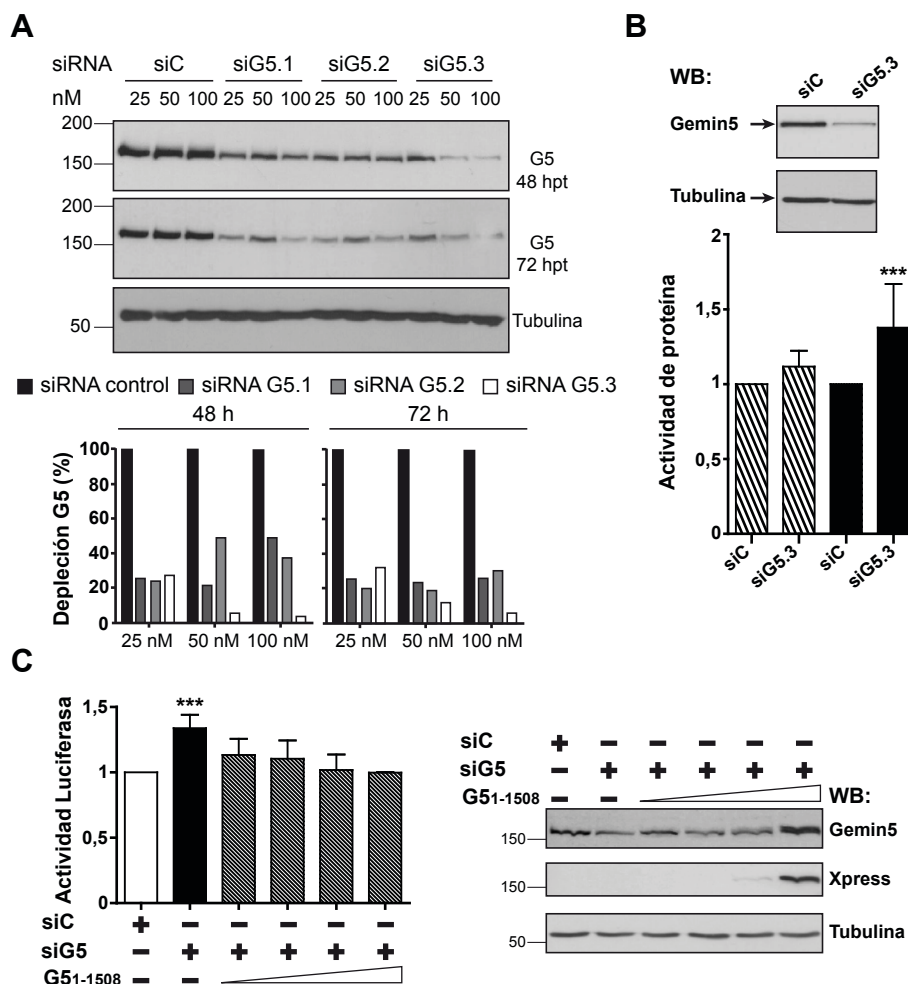


Figura 12. Efecto de la depleción de Gemin5 en células HEK293 sobre la síntesis de proteínas. (A) Análisis por WB de extractos de células HEK293 transfectadas con cantidades crecientes (25 a 100 nM) de tres siRNAs (G5.1, G5.2 y G5.3) dirigidos contra Gemin5 o un siRNA control (siC) sin dianas en mRNAs de mamíferos. Los extractos fueron recogidos a 48 o 72 h después de transfectarlas. Se usó tubulina como control de carga. La efectividad de la depleción de cada siRNA contra Gemin5 (columnas gris oscuro, gris claro o blancas), respecto al siC (columnas negras) se representó frente a la cantidad de siRNA utilizada. **(B)** La depleción de Gemin5 se usó para monitorizar la traducción IRES y cap-dependiente en transfecciones de cantidades iguales de pBIC. Cada experimento se repitió tres veces en pocillos duplicados. El efecto en la síntesis de proteínas se calculó como el porcentaje de CAT (columnas rayadas) y LUC (columnas negras) respecto al siC. Las columnas representan la media \pm desviación estándar (SD). (**P<0,001). **(C)** Efecto de la expresión de G5₁₋₁₅₀₈ sobre la traducción dependiente de IRES (columnas rayadas) medida como actividad LUC, relativa a los valores observados en el siC (columnas blancas). Las columnas negras representan el efecto de la depleción de Gemin5 en la traducción dirigida por IRES. Los valores representan la media \pm SD (**P<0,001). El silenciamiento de la proteína endógena (p170) y la expresión de la construcción G5₁₋₁₅₀₈ se determinaron por WB con el anticuerpo anti-Xpress.

Con el mismo abordaje experimental observamos que el extremo C-terminal, G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈, induce una inhibición dependiente de dosis de la traducción mediada por IRES, recuperando niveles similares a los observados con el siRNA control (Fig.14B). La inhibición de la traducción dirigida por IRES de G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈ también se observó en ensayos de traducción *in vitro*, en los que el RNA que codifica el polipéptido de Gemin5 se expresó 15 minutos antes que el RNA bicistrónico (Fig.14C).

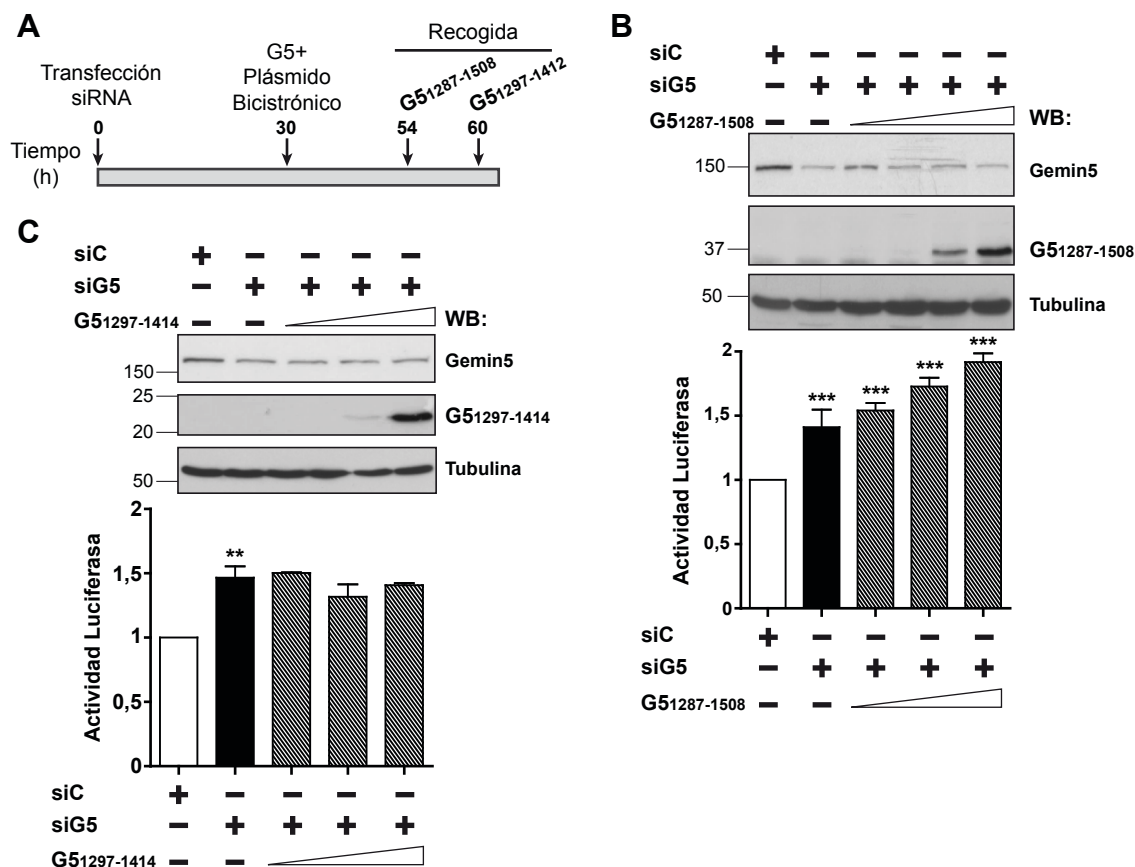


Figura 13. Efecto sobre la actividad IRES de los polipéptidos truncados de la región C-terminal de Gemin5. (A) Diagrama del ensayo de silenciamiento y co-transfección, indicando los tiempos de recogida (h). WB de Gemin5 que muestra el silenciamiento de la proteína endógena (banda p170) y la expresión de las construcciones G5₁₂₈₇₋₁₅₀₈ (B) y G5₁₂₉₇₋₁₄₁₂ (C) resuelto en SDS-PAGE (15%) junto con el efecto en la traducción dependiente de IRES (columnas rayadas) monitorizada como actividad LUC, relativo a los valores observados en las células tratados con el siRNA control (columnas blancas). Las columnas negras representan el efecto de la depleción de Gemin5 en la traducción dirigida por IRES. Los valores representan la media ± SD (***) P < 0,001, ** P < 0,005). La movilidad de los marcadores de peso molecular se indica a la izquierda de cada WB.

No se detectaron cambios significativos en la traducción dependiente de cap, detectada a través de la proteína CAT, con ninguno de estos fragmentos de Gemin5 (Fig.15).

De manera similar, analizamos el efecto de las proteínas G5₈₄₅₋₁₅₀₈ y G5₈₄₅₋₁₄₃₆ (Fig.16A), ajustando los tiempos de expresión a las condiciones óptimas determinadas anteriormente (Fig. 11B). El análisis de estos polipéptidos es interesante debido a que corresponden a los

productos de proteólisis de Gemin5 detectados en células infectadas, p85 y p57, respectivamente (Pineiro et al., 2013). Mientras que p85 es un producto que aparece como una banda débil en las células infectadas, p57 se acumula durante la infección. La expresión de G5₈₄₅₋₁₅₀₈ mostró estimulación estadísticamente significativa de la traducción IRES-dependiente (**P<0,005) (Fig.16B), en consonancia con los datos de G5₁₂₈₇₋₁₅₀₈ (Fig.13B). Por el contrario, la expresión de G5₈₄₅₋₁₄₃₆, que carece del extremo C-terminal (Fig. 11A), no tuvo efecto (Fig.16C).

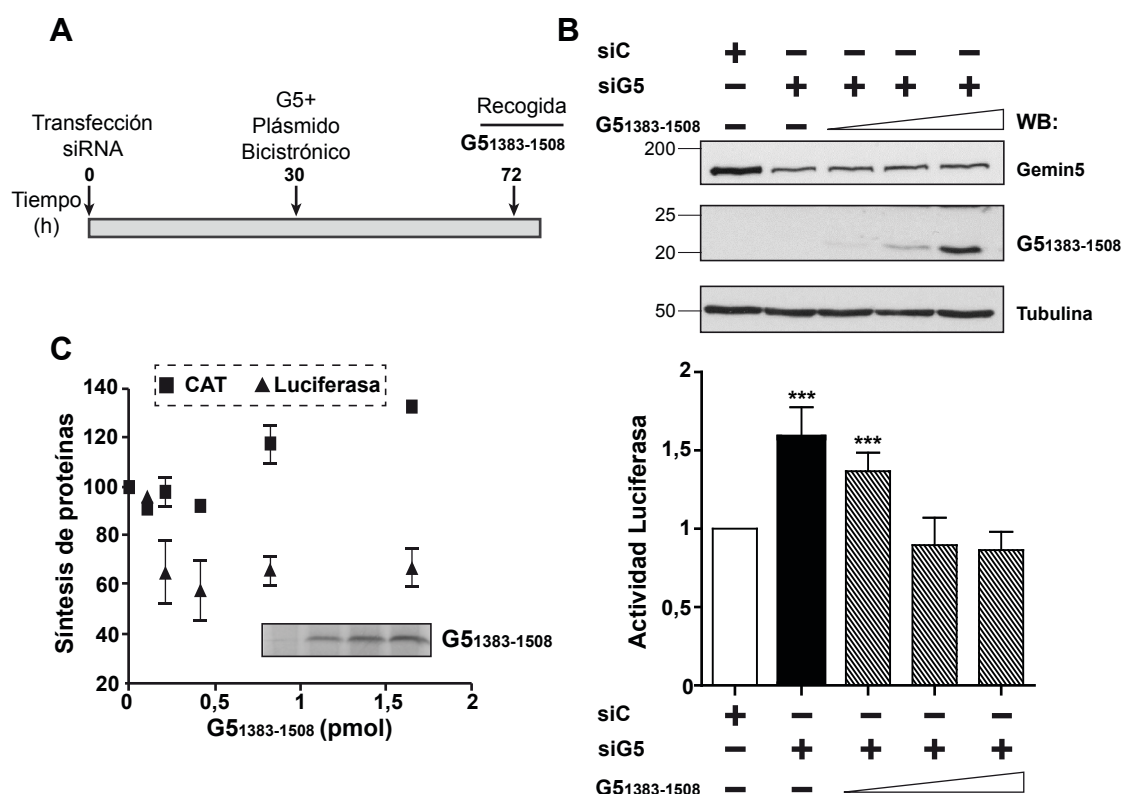


Figura 14. Efecto represor de la actividad IRES del extremo C-terminal de Gemin5 in vivo e in vitro. (A) Diagrama del ensayo de silenciamiento y co-transfección de la construcción G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈. (B) WB de Gemin5 que muestra el silenciamiento de la proteína endógena (banda p170) y la expresión de la construcción G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈ resuelta en SDS-PAGE 15%. Efecto de la expresión de G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈ en la traducción dependiente de IRES (columnas rayadas) monitorizada como actividad LUC, relativo a los valores observados en las células tratadas con el siRNA control (columnas blancas). Las columnas negras representan el efecto de la depleción de Gemin5 en la traducción dirigida por IRES. Los valores representan la media ± SD (**P<0,005; ***P<0,001). (C) El transcrito G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈ (0,1-5 pmol) se sintetizó in vitro y se tradujo en lisado de reticulocitos de conejo suplementado con 35S-metionina (10μCi) 15 min antes de añadir el RNA bicistrónico (200 ng) que contiene el IRES de FMDV entre CAT y luciferasa. Las proteínas marcadas con 35S-metionina se resolvieron en SDS-PAGE seguido de autorradiografías de los geles secos. La intensidad de la proteína luciferasa marcada con 35S-metionina (cuadrados) y el CAT (triángulos) se midieron en un densitómetro. Los valores representan la media ± SD de tres experimentos normalizados con el carril que no contiene el RNA de G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈.

En conjunto, estos resultados nos llevan a concluir que el efecto represor que ejerce Gemin5 sobre la traducción dependiente de IRES reside específicamente en el dominio RBS2, que comprende los aminoácidos 1383-1508, en el extremo C-terminal de la proteína.

RESULTADOS

En resumen, nuestro trabajo ha determinado que la región C-terminal de Gemin5 es una región intrínsecamente desestructurada que contiene un sitio de unión a RNA bipartito y que el extremo C-terminal es el responsable de reprimir la traducción dependiente del IRES de FMDV (Fernandez-Chamorro et al., 2014).

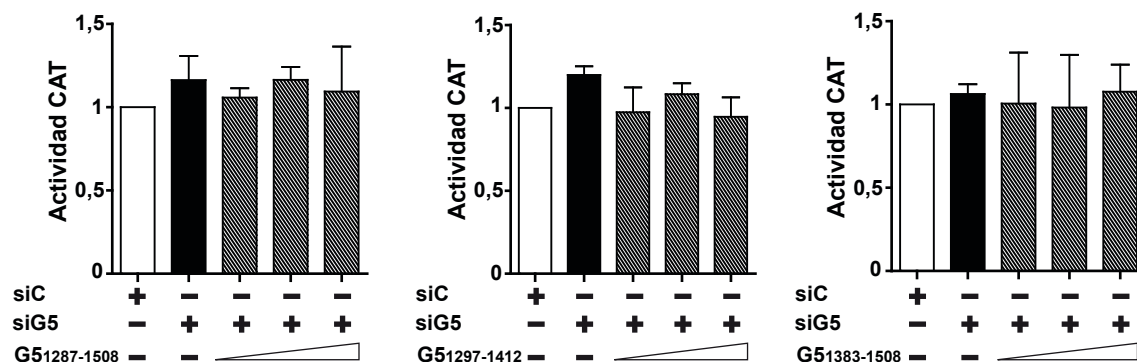


Figura 15. Efecto de la expresión de los polipéptidos de Gemin5 en la traducción cap-dependiente. Se transfectaron células deplecionadas de Gemin5 con cantidades crecientes de las construcciones de Gemin5 indicadas y el plásmido bicistrónico. La traducción dependiente de cap se monitorizó a través de la actividad CAT, relativo a los valores observados en las células tratadas con el siRNA control (columnas blancas). Las columnas negras representan el efecto de la depleción de Gemin5 en la traducción dirigida por cap, mientras que las barras rayadas indican los valores de actividad CAT observada en las células transfectadas con las construcciones de Gemin5.

1.5 Relación entre la capacidad de Gemin5 para modular la traducción y los productos de proteólisis observados en células infectadas

Gemin5 es proteolizada por FMDV en células infectadas debido a la acción de la proteasa L, generando dos productos p85 y p57 (Pineiro et al., 2012). La secuencia reconocida por la proteasa L para generar p85 y p57 está compuesta por aminoácidos básicos Arg-Lys-Ala-Arg (RKAR) en el caso de p85, y Thr-Lys-Arg-Leu-Thr (TKRL) para p57 (Fernandez-Chamorro et al., 2014). Los dos sitios son parcialmente coincidentes con el sitio de corte de la poliproteína viral (L-VP4) y Daxx (Fig.17A).

Como se ha dicho anteriormente, los productos de corte de la proteasa L son similares a los polipéptidos G5₈₄₅₋₁₄₃₆ y G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈ (Fig.14 y 16). Debido a la capacidad diferencial de regular la traducción en células transfectadas, es posible sugerir que los productos de proteólisis acumulados durante la infección podrían ejercer un efecto similar en el inicio de la traducción que los polipéptidos de Gemin5 estudiados en esta Tesis (Fig.17B). En este contexto, la proteína completa se comportaría como un represor de la traducción IRES-dependiente. La pérdida de la región N-terminal, que contiene las repeticiones WD, provocaría que el producto G5₈₄₅₋₁₅₀₈ tenga un comportamiento opuesto, estimulando la actividad IRES, de la misma manera que el fragmento G5₁₂₈₇₋₁₅₀₈. Sin embargo, el extremo C-terminal G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈ inhibiría la traducción IRES-dependiente.

Para explicar esta diversidad de comportamientos proponemos que la proteína sufre cambios estructurales según el polipéptido que se exprese. Estos cambios podrían modificar la exposición del dominio RBS2 (Fig.17B).

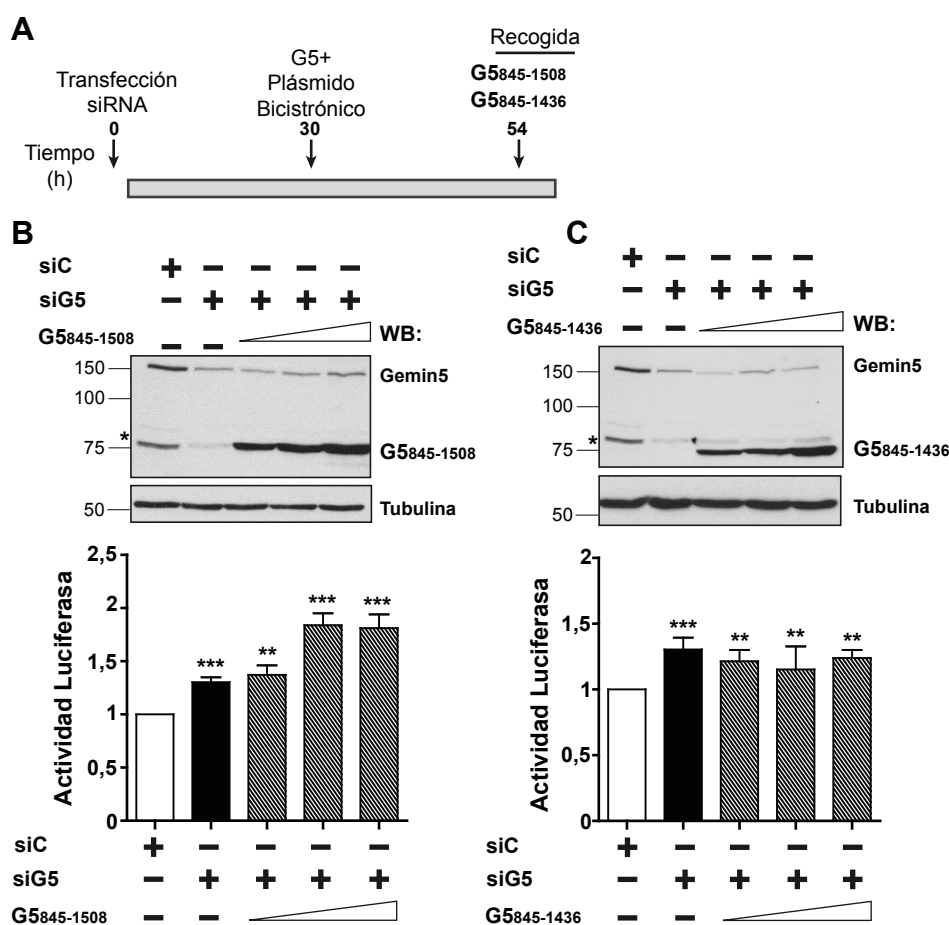


Figura 16. Efecto de los polipéptidos G5⁸⁴⁵⁻¹⁵⁰⁸ y G5⁸⁴⁵⁻¹⁴³⁶ en la actividad IRES. (A) Diagrama del ensayo de silenciamiento y co-transfección. Efecto de la expresión de G5⁸⁴⁵⁻¹⁵⁰⁸ (B) y G5⁸⁴⁵⁻¹⁴³⁶ (C) en la traducción dependiente de IRES (columnas rayadas) monitorizada como actividad LUC, representado según se ha indicado en la figura 12.

En resumen, la información obtenida para cada uno de los polipéptidos de Gemin5 permite sugerir un modelo que relaciona el procesamiento de la proteína durante la infección con el efecto observado sobre la traducción dependiente de IRES (Fig.17C). Al inicio de la infección, la proteína Gemin5 inhibe la traducción del RNA. Sin embargo, a medida que la infección avanza, la proteasa L del virus proteoliza Gemin5 generando el producto p85 (G5⁸⁴⁵⁻¹⁵⁰⁸), que se comporta como un estimulador de la actividad IRES presente en el genoma de FMDV. Seguidamente, p85 es proteolizada generando dos productos, p57 (G5⁸⁴⁵⁻¹⁴¹²) y p21, siendo este último indetectable por WB (Pineiro et al., 2012). El péptido p21 contiene solamente RBS2, por lo tanto se comportaría como un inhibidor la traducción viral. La imposibilidad de detectarlo experimentalmente en células infectadas sugiere que es inestable. El producto p57, que se acumula en las células infectadas, mantiene la capacidad de unir el IRES sin afectar la traducción (Fig.17C).

Este modelo representa un ejemplo de adaptación de las estrategias viral para esquivar los mecanismos de inhibición celulares, a la vez que se aprovechan los factores celulares en beneficio propio.

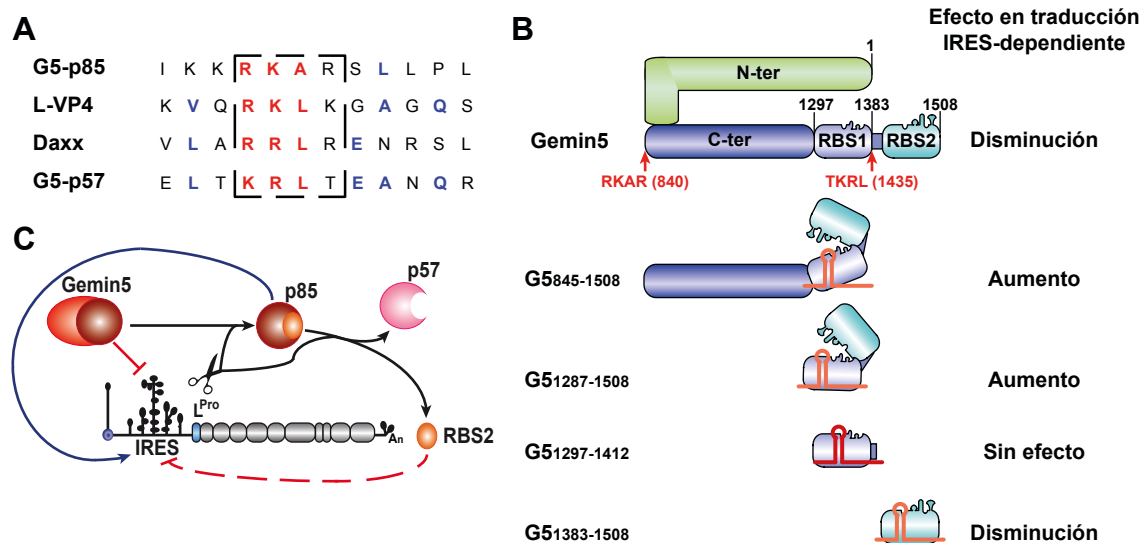


Figura 17. Relación entre los productos de corte de la proteasa L de FMDV en la proteína Gemin5 y su efecto sobre traducción. (A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los motivos reconocidos por la proteasa L en la secuencia de Gemin5 (G5-p85 y G5-p57), la poliproteína de (L-VP4) y el sitio de corte de la proteína Daxx. (B) Modelo hipotético del efecto diferencial de los polipéptidos de Gemin5 en el control de la traducción. La región C-terminal se determina a partir del residuo 845 (caja azul), dentro de la cual se encuentran los sitios de unión a RNA RBS1 (azul oscuro) y RBS2 (azul claro). Las flechas indican los sitios de reconocimiento de la proteasa L (RKAR y TKRL). El dominio 5 del IRES de FMDV se muestra como una horquilla en rojo o naranja, indicando la mayor o menor eficiencia de unión de los polipéptidos de Gemin5 en base a los ensayos de retardo en gel y crosslink por luz UV. (C) Modelo hipotético de la relación entre la proteólisis de Gemin5 y su influencia sobre la traducción dependiente de IRES durante la infección por FMDV. Para más detalle, ver texto.

2. Nuevas proteínas de interacción con el dominio 3 del IRES de FMDV

El elemento IRES es una región de RNA con una estructura secundaria muy flexible e interacciones terciarias, (Fig.3) que dirige la traducción de la poliproteína viral durante la infección mediante un mecanismo independiente de cap. El dominio 3 del elemento IRES es el mayor de los dominios que lo componen (210 nucleótidos). Estructuralmente se divide en dos regiones diferentes; la región apical consta de varias horquillas sostenidas por un cruce de cuatro caminos, conservadas filogenéticamente. A su vez, los bucles contienen los motivos conservados esenciales GNRA, RAAA y ACCCCA, implicados en el mantenimiento de la estructura tridimensional del IRES a través de interacciones terciarias. La región basal se compone de una región de doble banda interrumpida por varios bucles internos y algunos pares de bases no canónicos (Lozano et al., 2016). Al inicio de esta Tesis, se habían descrito un número reducido de proteínas capaces de reconocerlo (Pacheco et al., 2008).

Dada la complejidad estructural del dominio 3, nuestro trabajo se ha centrado en identificar nuevas proteínas capaces de unirse diferencialmente a los distintos motivos estructurales del dominio 3. Para ello, se dividió en cuatro transcritos que corresponden a los subdominios brazo 3a (SL3a), que contiene el motivo conservado GNRA (159-194); la región apical (SL3abc), que incluye la estructura cruciforme que tiene los motivos GNRA y RAAA (151 y 225); el subdominio que abarca toda la región apical hasta el bucle rico en C del dominio 3 (137 al 246) y, finalmente, el dominio 3 completo (D3) (89 al 299) (Fig.18A). Posteriormente, se procedió a purificar e identificar las proteínas unidas diferencialmente a cada uno de los subdominios mediante espectrometría de masas. Tras analizar los datos de proteómica, se eligieron algunas de las proteínas identificadas por su novedad y especificidad de interacción con los subdominios, para validar su capacidad de unión a los distintos motivos estructurales del dominio 3 y determinar su efecto sobre la traducción.

2.1. Purificación de RNAs quimera que contienen los subdominios del dominio 3

Para el estudio de la proteínas unidas a los transcritos en que hemos dividido el dominio 3 del IRES de FMDV (Fig.18A) se empleó la tecnología de tRNAs quimera (Ponchon et al., 2009). Estas construcciones se basan en sustituir la región del anticodón de un tRNA por la secuencia de interés. De este modo, el esqueleto del tRNA actúa como soporte de la estructura de la región introducida en el mismo, permitiendo estabilizar su plegamiento. Además, el tRNA quimera contiene un aptámero de estreptavidina que facilita su purificación utilizando bolas magnéticas recubiertas de estreptavidina y un soporte magnético (Fig.18B). El RNA control se compone del esqueleto de tRNA sin ninguna sustitución en la región del anticodón.

RESULTADOS

Al realizar la extracción de RNA se obtuvo el RNA quimera junto con RNAs bacterianos abundantes (rRNA y 5S rRNA) como se observó en geles desnaturalizantes (Fig.18B, líneas 1, 3, 5 y 7). La presencia del aptámero de estreptavidina permitió la purificación de los RNAs de interés (Fig.18B, líneas 2, 4, 6 y 8).

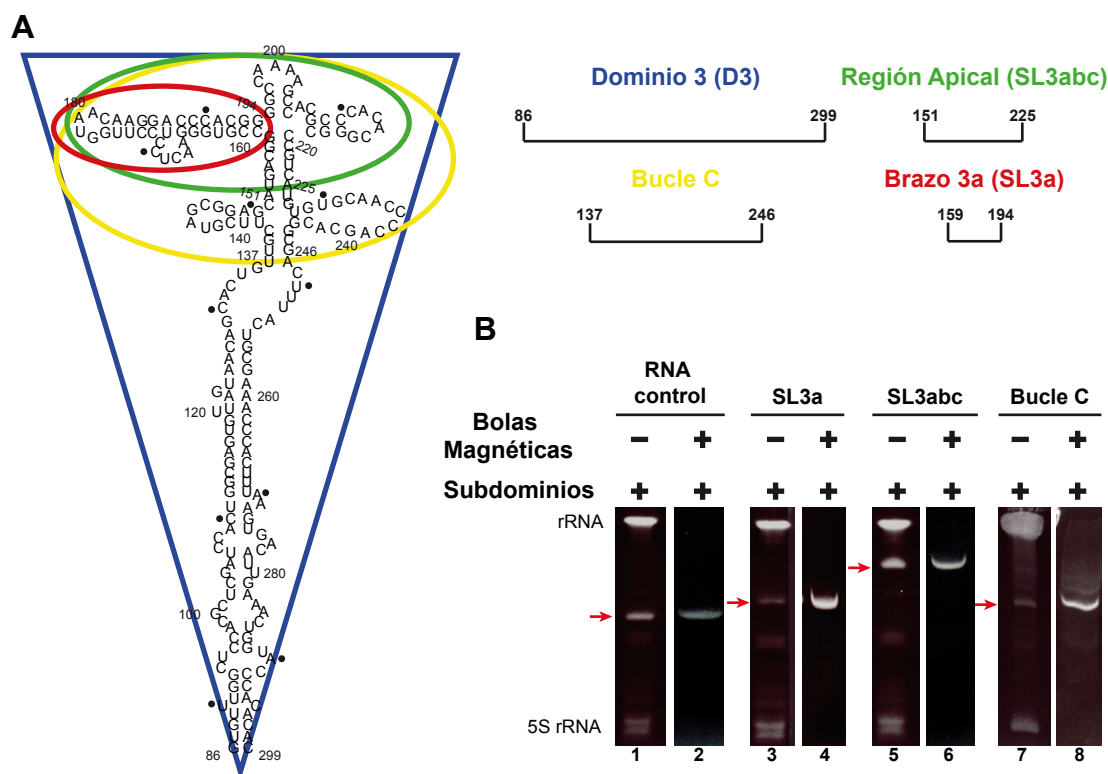


Figura 18. Obtención de los RNAs quimera de los subdominios del IRES. (A) Esquema de los subdominios del dominio 3. Los números indican las posiciones nucleotídicas respecto al IRES completo y los puntos indican intervalos de 10 nucleótidos. (B) Imagen de geles desnaturalizantes cargados con RNAs quimeras. Las flechas rojas señalan la banda correspondiente al RNA quimera.

2.2. Aislamiento e identificación de proteínas asociadas al dominio 3 del IRES

La purificación de las proteínas unidas a los subdominios SL3a, SL3abc, Bucle C y D3 se llevó a cabo mediante ensayos de afinidad usando extractos S10 de células HeLa con los RNAs quimera, previamente acoplados a las bolas magnéticas (Fig.19A). Las proteínas eluidas con los distintos subdominios se analizaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE (Fig.19B). Se observó que cada uno de los subdominios presentaba un patrón de proteínas diferentes. Las bandas destacadas con una flecha roja corresponden a proteínas purificadas con cada subdominio analizado, presentado un patrón de peso molecular distinto según el RNA de interés empleado. Por otro lado, las bandas señaladas con una flecha negra corresponden a proteínas con una movilidad electroforética similar a las presentes en el RNA control.

Estos datos sugieren que el dominio 3 tiene la capacidad de interactuar diferencialmente con proteínas en función de los motivos estructurales presentes en sus subdominios.

Para identificar las proteínas que se unen al dominio 3 llevamos a cabo un análisis proteómico en dos ensayos independientes. Las proteínas eluidas con cada subdominio se sometieron a una digestión en gel con tripsina, seguido de identificación de los péptidos mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS/MS). Solo se consideraron aquellas proteínas identificadas con, al menos, dos péptidos y un FDR<0,01. Se identificaron 660 proteínas en el RNA control, 940 en SL3a, 608 en SL3abc, 757 en el Bucle C y 630 en D3 (Fig.20A). Después de la clasificación de las proteínas en grupos funcionales, se descartaron las proteínas con una puntuación menor al 10% de la puntuación máxima. Tras este paso, quedaron 484 proteínas en el RNA control, 505 en SL3a, 462 en SL3abc, 559 en el Bucle C, y 470 en el D3 (Fig.20B). Seguidamente, se eliminaron las proteínas que no aparecían en los duplicados, reduciéndose el número de proteínas identificadas (230 proteínas en el RNA control, 214 SL3a, 192 en SL3abc, 270 en el subdominio Bucle C, y 209 proteínas D3) (Fig.20C). Por último, sustrajimos las proteínas identificadas en el RNA control, para descartar las proteínas que reconocían el esqueleto de tRNA. Esta operación dio lugar a 156 proteínas asociadas a SL3a, 143 en SL3abc, 214 en Bucle C y 158 en D3 (Fig.20D). En general, el número final de proteínas identificadas con cada uno de los subdominios es similar, siendo algo mayor para el subdominio del bucle C y aproximadamente el mismo para los subdominios 3A, RA y D3.

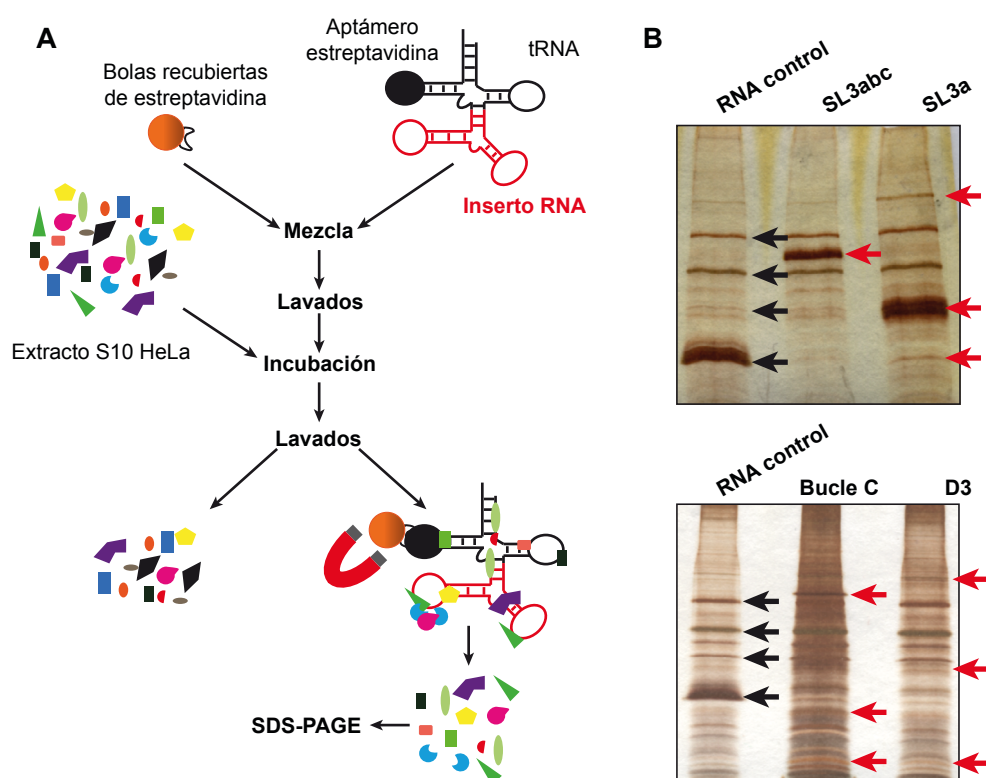


Figura 19. Purificación de las proteínas asociadas a los subdominios del D3. (A) Esquema de la purificación de las proteínas que reconocen los RNAs quimera. (B) Imagen de SDS-PAGE (10%) teñido con plata del eluido de las proteínas purificadas con los subdominios del D3. Las flechas negras señalan las bandas presentes en todas las purificaciones, incluyendo el control. Las flechas rojas indican las bandas específicas de cada subdominio del D3

RESULTADOS

La distribución de las proteínas entre los cuatro subdominios del dominio 3 indica una asociación diferencial de los factores (Fig.20E). Se identificó un número mayor de proteínas específicas de cada subdominio que en cualquier combinación de los mismos, además de proteínas comunes a los 4 subdominios (28). Entre las combinaciones de subdominios destacó la coincidencia entre las proteínas identificadas en el D3 y Bucle C (43) y en el SL3abc y SL3a (28). Estos datos sugirieron la presencia de dos zonas de interacción diferenciadas. Las combinaciones del D3 con la región apical (3 con SL3a, 6 con SL3abc y 7 con ambos) o el Bucle C (13 con SL3a, 7 con SL3abc y 13 con ambas), reforzaron la idea de dos zonas de interacción diferenciadas en el dominio 3, la región apical y la zona basal.

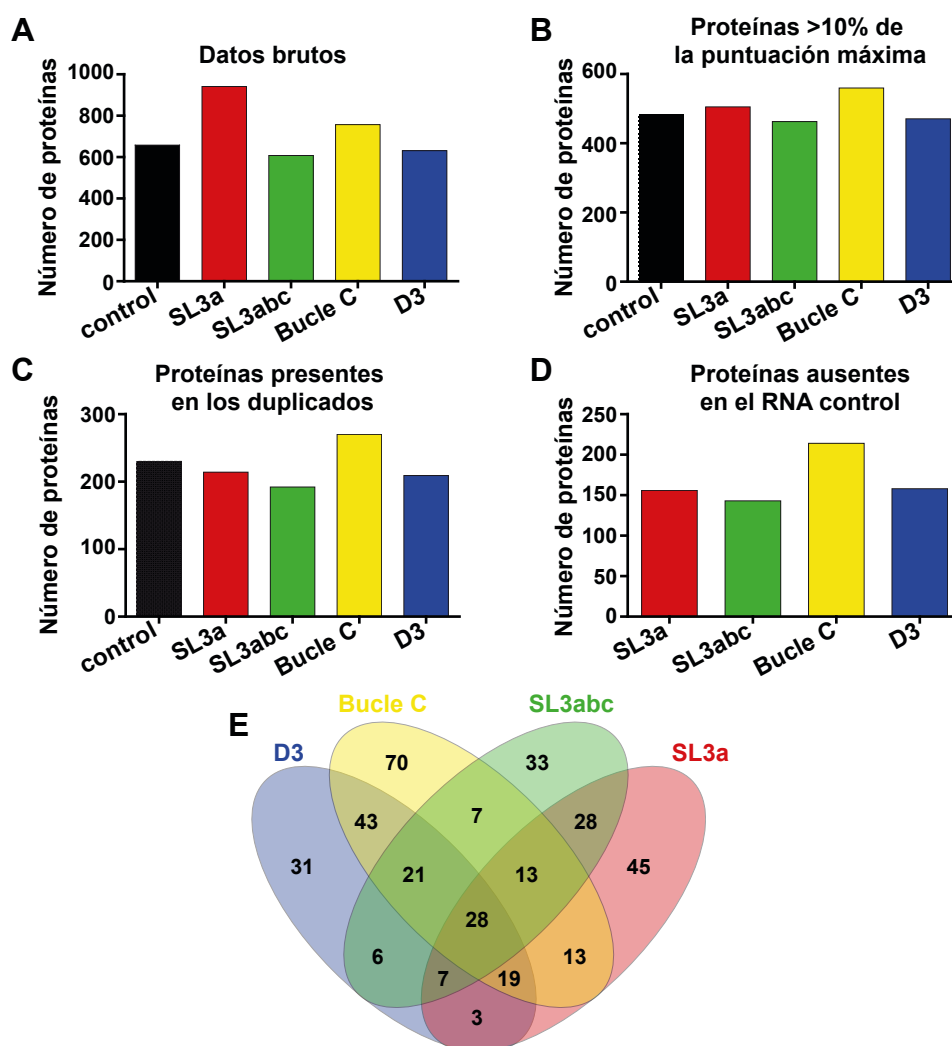


Figura 20. Análisis de los datos de espectrometría de masas. (A) Número total de proteínas identificadas con cada subdominio. Los colores indican el subdominio con el que se ha copurificado. (B) Número de proteínas identificadas tras eliminar las proteínas con puntuación menor al 10% de la puntuación máxima. (C) Proteínas identificadas en los duplicados. (D) Número de proteínas identificadas específicamente en cada subdominio, tras eliminar las presentes en el RNA control. (E) Diagrama de Venn con las proteínas coincidentes entre subdominios.

2.3. Las proteínas identificadas con el dominio 3 están implicadas en la localización del RNA, además de la traducción

Las proteínas que se identificaron con los subdominios de interés fueron clasificadas en grupos funcionales mediante métodos computacionales. Para ello, se realizó una búsqueda contra la base de datos de *Homo sapiens* presente en la plataforma PANTHER (<http://www.pantherdb.org>) (Mi et al., 2017). La mayoría de las proteínas purificadas corresponden a proteínas de unión a ácidos nucleicos (>30%) (Fig.21A), de acuerdo al procedimiento empleado para su purificación basado en afinidad a moléculas de RNA.

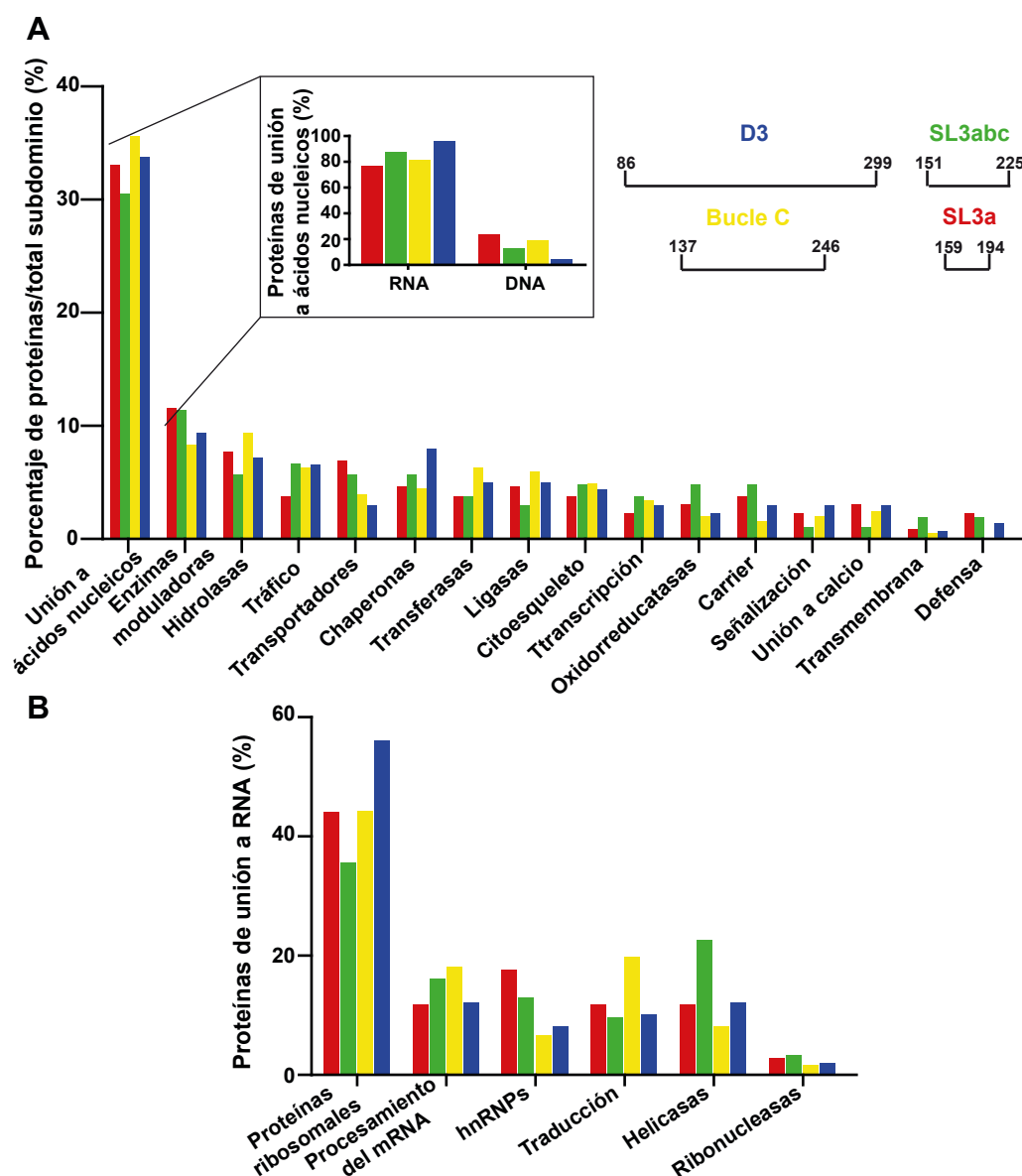


Figura 21. Clasificación funcional de las proteínas identificadas. (A) Distribución de las proteínas identificadas con cada subdominio mediante la plataforma PANTHER representadas como porcentaje respecto al total de proteínas de cada subdominio. (B) Proteínas de unión a RNA, representadas como porcentaje sobre el total de proteínas de unión a RNA en cada subdominio.

RESULTADOS

De hecho, la mayoría de las proteínas identificadas en este grupo corresponden a proteínas de unión a RNA (Fig.21A, inserto). Además, se identificaron enzimas moduladoras (10%), hidrolasas (8%), proteínas de transporte a membrana y transportadoras (6%), chaperonas, transferasas, ligasas, proteínas del citoesqueleto (5%), proteínas asociadas a transcripción, oxidoreductasas, cargadoras (3%), proteínas implicadas en señalización, unión a calcio, transmembrana y defensa (2%).

El análisis global de las proteínas identificadas mostró una distribución uniforme de las proteínas en cada subdominio. Atendiendo al porcentaje de proteínas identificadas en cada grupo funcional, ningún subdominio presentó una variación diferencial sobre el total de proteínas identificadas. Sin embargo, un examen sobre el tipo de proteínas de unión a RNA nos permite sacar nuevas conclusiones. La mayoría de estas proteínas corresponden a proteínas ribosomales ($\approx 40\%$) (Fig.21B). Además, se identificaron proteínas implicadas en el procesamiento del mRNA y hnRNPs (15%), proteínas implicadas en la traducción y helicasas de RNA (10%), así como ribonucleasas (2%). Curiosamente, el número de proteínas de unión a RNA identificadas en cada uno de los subdominios reveló diferencias importantes entre ellos. D3 muestra el mayor porcentaje de proteínas ribosomales, lo que sugiere que puede estar implicado en el anclaje del ribosoma. Por otro lado, en la purificación con el bucle C predominan factores implicados en la traducción, mientras que con el subdominio SL3abc son mayoritarias las helicasas. Por último, las hnRNPs están enriquecidas en la purificación con el subdominio SL3a (Fig.21B).

El análisis mediante la plataforma PANTHER es cualitativo. Para tener información estadísticamente significativa del tipo de proteínas identificadas con los subdominios recurrimos a la aplicación BiNGO de la plataforma Cytoscape. Esta aplicación permite un análisis funcional de las proteínas, además de un estudio de sobrerepresentación respecto al proteoma humano, representado en forma de red de interacciones (Maere et al., 2005). Para dicho análisis, se usó un test hipergeométrico, con una corrección por FDR de 0,01 y un valor de significatividad mínima de 5×10^{-3} para la clasificación por procesos biológicos (Fig.22). Con este análisis las proteínas se organizaron según su GO y se agruparon en nodos interconectados de un tamaño proporcional al número de proteínas que lo componen (representados como esferas). La agrupación de varios nodos relacionados conforma una red funcional (resaltado en azul).

Las redes identificadas en cada uno de los subdominios se analizaron por separado, calculando los p-value medios de cada red (Tabla 3). La red de interacciones obtenida con el subdominio SL3a indica que, con mayor probabilidad, esta región del IRES podría estar implicada en traducción, seguido de procesos de síntesis de aminoácidos y nucleótidos, así como en el transporte y localización de proteínas; también fueron estadísticamente significativas las redes de splicing, procesamiento y estabilidad del RNA, el transporte ER-Golgi y, finalmente, el transporte del RNA (Fig.22A).

El estudio del subdominio SL3abc mostró una red de interacciones que, de mayor a menor significatividad media, incluye proteínas implicadas en la traducción, seguida de splicing, procesamiento y estabilidad del RNA, transporte ER-Golgi, transporte y localización de proteínas.

Las redes de interacciones con valores menores de significatividad fueron las de proteínas presentes en la síntesis de aminoácidos y nucleótidos e inmunidad (Fig.22B) (Tabla 3).

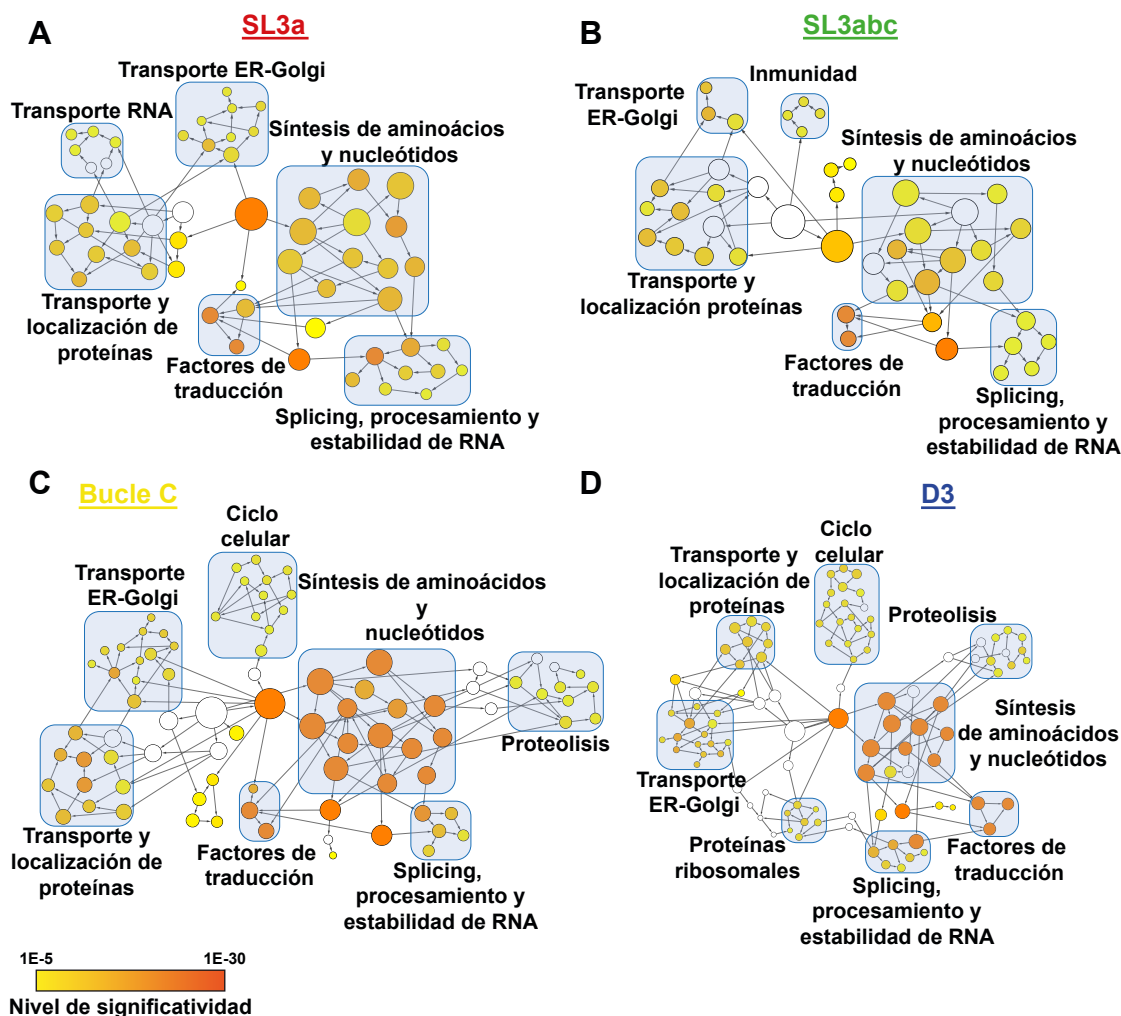


Figura 22. Redes de interacción de las proteínas identificadas. Representación en forma de redes funcionales de las proteínas identificadas con los subdominios SL3a (A), SL3abc (B), Bucle C (C) y D3 (D) obtenidas con la aplicación BinGO de la plataforma Cytoscape. Las esferas representan nudos de proteínas relacionadas funcionalmente; su tamaño es proporcional al número de proteínas que lo componen y su color indica la significatividad estadística. En azul claro se agrupan las redes funcionales, formadas por nudos relacionados. Las esferas blancas representan nudos creados por la aplicación para conectar nudos significativos. Las flechas indican el sentido de la relación entre nudos. Para simplificar, los nudos con valores de p-value < 10⁻⁵ no se han representado.

El estudio del subdominio Bucle C arrojó una red de interacciones con más nudos, donde se incluyen las redes de factores presentes en la traducción y proteínas implicadas en la síntesis de AA y nucleótidos, de mayor a menor valor de significatividad media (Tabla 3). Con valores de significatividad menores se identificaron la red de splicing, procesamiento y estabilidad de RNA, junto con las de transporte y localización de proteínas y transporte ER-Golgi. Curiosamente, aparecen dos nuevas redes, que sugieren que esta zona del IRES puede estar implicada en proteólisis y control del ciclo celular (Fig.22C).

Tabla 3. Significatividad estadística media (p-value) de las redes de proteínas identificadas con cada subdominio del dominio 3 respecto a un proteoma humano completo.

Redes de interacciones	Subdominios			
	SL3abc	SL3a	Bucle C	D3
Factores de traducción	$8,44 \times 10^{-6}$	$1,03 \times 10^{-10}$	$3,19 \times 10^{-29}$	$7,31 \times 10^{-30}$
Síntesis de aminoácidos y nucleótidos	$1,8 \times 10^{-5}$	$8,47 \times 10^{-4}$	$1,14 \times 10^{-12}$	$8,67 \times 10^{-12}$
Transporte proteínas	$8,43 \times 10^{-5}$	$5,13 \times 10^{-4}$	$4,7 \times 10^{-5}$	$1,69 \times 10^{-4}$
Procesamiento de RNA	$1,71 \times 10^{-4}$	$2,08 \times 10^{-5}$	$1,96 \times 10^{-5}$	$7,7 \times 10^{-5}$
Transporte ER-Golgi	$7,2 \times 10^{-4}$	$3,22 \times 10^{-5}$	$3,23 \times 10^{-4}$	$5,35 \times 10^{-5}$
Proteínas ribosomales	-	-	-	$5,61 \times 10^{-4}$
Transporte RNA	$4,98 \times 10^{-3}$	-	-	-
Ciclo Celular	-	-	3×10^{-3}	$6,4 \times 10^{-4}$
Proteólisis	-	-	$2,94 \times 10^{-3}$	$3,06 \times 10^{-3}$
Inmunidad	-	$8,47 \times 10^{-3}$	-	-

El resultado obtenido con el D3 contiene las redes presentes en todos los subdominios, pero con valores de significatividad media más altos (Tabla 3): factores de traducción, síntesis de aminoácidos y nucleótidos, transporte ER-Golgi, splicing, procesamiento y estabilidad de RNA, transporte y localización de proteínas. La red correspondiente a proteínas ribosomales solo se identificó en este subdominio (Fig.22D) (Tabla 3).

El análisis comparativo de los distintos subdominios indica una tendencia de ganancia de funciones a medida que estudiamos un transcrito mayor (Fig.22B, C, D y Tabla 3). Esto sugiere una distribución modular de las funciones que desempeña el dominio 3, que está asociada a motivos estructurales. Las redes de síntesis de aminoácidos y nucleótidos, factores de traducción, transporte y localización de proteínas, transporte ER-Golgi, splicing, procesamiento y estabilidad de RNA se conservan para todos los transcritos. Las redes de factores de traducción y procesamiento de RNA son esperables, debido al tipo de RNA empleado en la purificación. Sin embargo, resultó muy novedoso que todos los subdominios del dominio 3 mostraran altos niveles de significatividad de las redes de proteínas asociadas al transporte ER-Golgi y al transporte y localización de proteínas (p-value desde $\approx 7 \times 10^{-4}$ hasta $\approx 4 \times 10^{-5}$). Estas redes aumentan en número de proteínas a medida que el subdominio es mayor.

Este dato sugiere que el dominio 3 puede estar implicado no solo en la función de regular la iniciación interna de la traducción, sino en dirigir el RNA viral hacia la zona de ER y Golgi, una zona rica en ribosomas y donde se desarrollan los procesos de maduración de proteínas y formación de vesículas y membranas (Reid and Nicchitta, 2015).

2.4. Proteínas diferenciales de los subdominios estructurales del dominio 3

Una vez realizado el análisis estadístico con la aplicación BinGO, se analizaron las proteínas identificadas en los nudos de las redes que presentaban mayor significatividad y novedad.

En concreto, los nudos de proteínas implicadas en el transporte entre orgánulos, los de proteínas reguladoras del transporte celular y los de proteínas implicadas en el ciclo del RNA (RBPs) (Fig. 23).

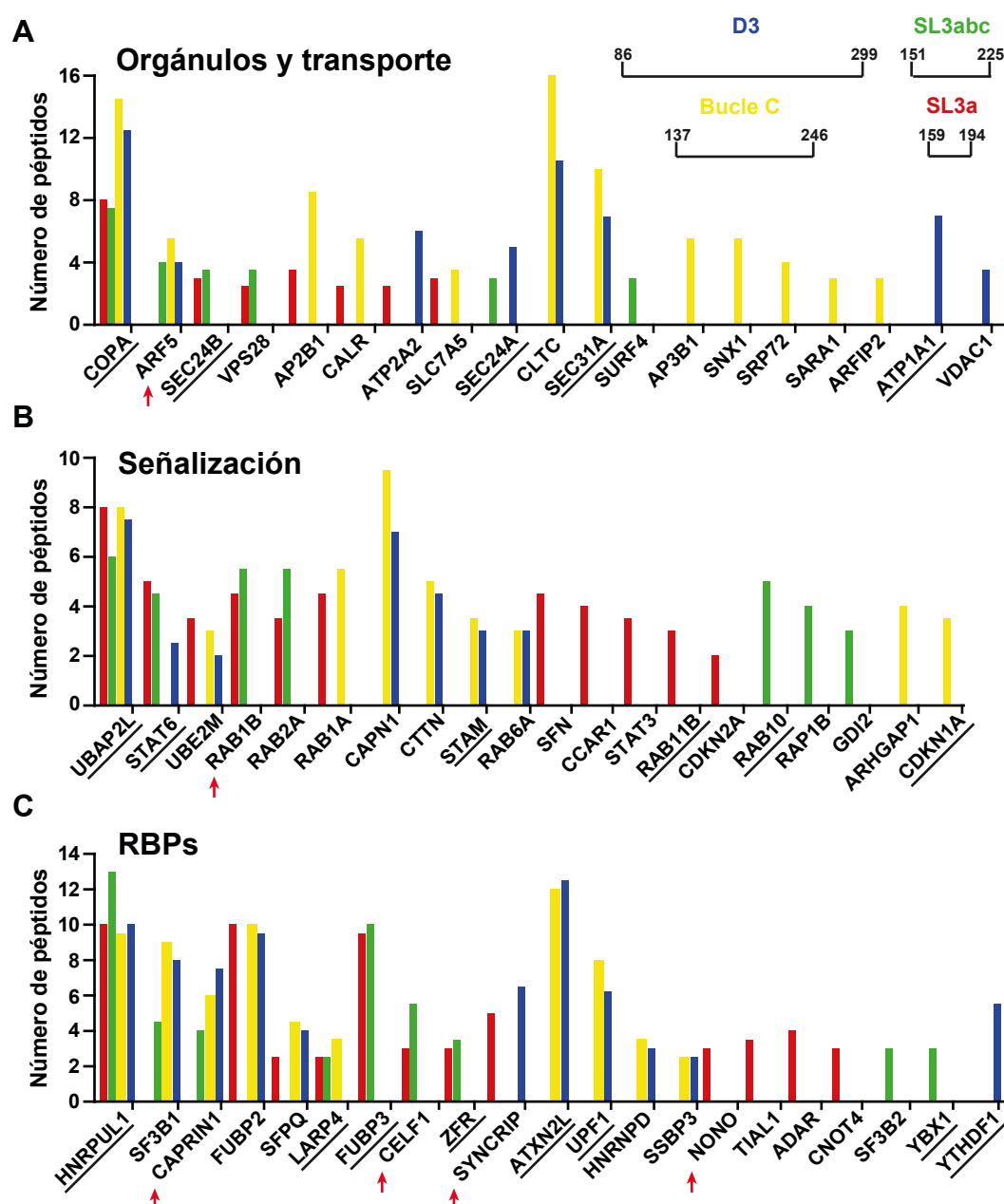


Figura 23. Proteínas asociadas diferencialmente a los subdominios del D3. Representación del número de péptidos de las proteínas asociadas a orgánulos o implicadas en transporte (A), proteínas de señalización (B), y proteínas de unión a RNA (C), ordenadas en función del número de subdominios en los que se identificaron, de menor a mayor tamaño del RNA quimera, con los datos de la figura 4. Las flechas rojas señalan las proteínas seleccionadas para la validación de su asociación a los subdominios del D3; las proteínas subrayadas se mencionan en el texto.

En el análisis por GO de las proteínas purificadas con los distintos transcritos del dominio 3 aparecieron de manera consistente redes de proteínas asociadas al transporte y localización de proteínas, así como al transporte ER-Golgi (Fig.7). Por ello, decidimos analizar en detalle las proteínas pertenecientes a los nudos de esta red (Fig.23A). COPA, una de las proteínas integrales del coatómero (Gaynor et al., 1998), se identificó en los cuatro subdominios. ARF5 se identificó en la mayoría de ellos, excepto en SL3a. Sec24B, implicada en el transporte COPII, se identificó con los dos subdominios de la región apical (SL3a y SL3abc), mientras que Sec31A, otro de los componentes de la ruta COPII, se identificó con los subdominios que contienen la región basal (Bucle C y SL3abc). Una proteína de esta ruta de transporte, Sec24A, se identificó con los subdominios SL3abc y D3. También se identificaron proteínas unidas a un único dominio, como es el caso de Sar1a, proteína reguladora de la ruta COPII, que aparece solo con el Bucl C, o el transportador ATP1A1 con D3. De todas ellas, seleccionamos ARF5 (Fig.23A, con flecha roja) para un estudio posterior, debido a que fue identificada en todos los transcritos, excepto SL3a.

Debido a que aparecieron muchas proteínas de la familia de Rab, implicadas en la regulación de los procesos de transporte del ER al Golgi y la formación de vesículas, centramos nuestro interés en las proteínas de señalización (Fig.23B). La proteína asociada a ubiquitinación 2 (UBAP2L), implicada en procesos de ubiquitinación (Wilde et al., 2011), se identificó con todos los subdominios. El transductor de señales y activador de la transcripción 6 (STAT6) es un factor de transcripción implicado en la respuesta inmune mediada por interleuquina 4 (Goenka and Kaplan, 2011), que se identificó con todos los subdominios menos el bucle C. Rab1b y Rab2 se identificaron con los subdominios de la región apical (SL3a y SL3abc). Por otro lado, la proteína de transducción de señal STAM, junto con Rab6a, se identificaron con la región basal (Bucle C y D3). Otras proteínas de la familia Rab se identificaron unidas a un único subdominio, como Rab11b (SL3a) o Rab10 (SL3abc). La proteína de regulación del ciclo celular, CDKN1A, se identificó unida al subdominio Bucl C. De todas ellas, seleccionamos Rab1b (Fig.23B, con flecha roja), una proteína descrita como reguladora del transporte ER al Golgi (Alvarez et al., 2003; Monetta et al., 2007), que solo se identificó con la región apical del dominio 3 (SL3a y SL3abc).

Por último, centramos nuestro interés en los nudos que conforman la red de RBPs (helicinas, factores de traducción, proteínas de splicing, etc.) (Fig.23C), descartando las proteínas ribosomales que fueron objeto de un estudio independiente. En este grupo solo se identificó una proteína presente en todos los subdominios, hnRNPUL1. Otras proteínas se identificaron con tres subdominios, como Caprin1 (Thandapani et al., 2013) o la proteína 4 de la familia con dominios riboproteómicos La (LARP4) (Yang et al., 2011). También se identificaron proteínas comunes a los subdominios de la región apical (SL3a y SL3abc), como la proteína de unión al elemento Far (FUBP3) (Chung et al., 2006), la proteína de unión a RNA con ZnF (ZFR) (Glisovic et al., 2008) o Celf1 (Edwards et al., 2011); a los subdominios que contienen la región basal (Bucle C y D3), como la ataxina 2 (ATXN2L) o el factor de regulación del mRNA sin-sentido (UPF1) (Kurosaki and Maquat, 2013), del que se hablará en el apartado 3 de esta Tesis, mientras que SYNCRIP (Mourelatos et al., 2001) se identificó con SL3a y D3. Finalmente, algunas proteínas solo se identificaron con

un subdominio, como NONO (Basu et al., 1997) (SL3a), la proteína de unión a cajas de pirimidinas (YBX1) (Lyabin et al., 2014) (SL3abc) o la proteína de unión a RNA metilado YTHDF1 (Wang et al., 2015) (D3).

En la búsqueda de RBPs que reconozcan específicamente motivos estructurales usamos el criterio de que se unieran diferencialmente a algún subdominio (Fig.23C, destacado con flechas rojas). Por ejemplo, Caprin1 se identificó en todos, excepto en SL3a; SYNCRIP se purificó con SL3a y D3; NONO solo se identificó con SL3a; Celf1 con la región apical del dominio 3 (SL3a y SL3abc). Además, seleccionamos dos proteínas ribosomales, RPS25 y el receptor de la quinasa C activada (Rack1), implicadas en el inicio de la traducción mediante mecanismos independientes de la estructura cap (Hertz et al., 2013; Majzoub et al., 2014).

2.5. El dominio 3 del IRES de FMDV está implicado en la interacción con el ribosoma

Para discriminar si la identificación de las proteínas mencionadas se debe a una unión directa de éstas con los subdominios del dominio 3, o es una interacción mediada por otros factores, se llevaron a cabo abordajes experimentales usando proteínas purificadas (Fig.24A). Estos estudios consistieron en ensayos de crosslink por luz UV usando como sonda los transcritos del dominio 3 (Fig.24B) y ensayos de retardo en gel, que determinan la afinidad RNA-proteína en geles nativos.

Para los ensayos de retardo en gel se usaron como control dos proteínas cuyo sitio de unión al dominio 3 es conocido; PCBP2 interacciona con zonas ricas en C (Makeyev and Liebhaber, 2002) y Ebp1 (reconoce la región de doble banda del dominio 3 (Pilipenko et al., 2000)). PCBP2 muestra una afinidad similar por el RNA D3 ($K_d \approx 0,5$ nM) y Bucle C ($K_d \approx 0,86$ nM), significativamente mayor que por SL3abc y SL3a (Fig.24C-D). Por el contrario, Ebp1 solo da lugar a la formación de un complejo de retardo con el D3 ($K_d \approx 3$ nM) (Fig.24C-D), mientras que con el resto de dominios el retardo es muy débil

Dado que se ha propuesto que la región apical del dominio 3 del IRES de FMDV pueda plegarse adoptando una estructura similar a la de un tRNA (Serrano et al., 2007) y que el análisis de GO ha mostrado que con el transcrito D3 se purifican proteínas ribosomales de manera más significativa que para el resto de transcritos, estudiamos dos proteínas ribosomales, Rack1 y RPS25. Estas dos proteínas pertenecen a la subunidad 40S del ribosoma, y se localizan próximas a la cabeza del mismo (Nilsson et al., 2004; Nishiyama et al., 2007), cerca la una de la otra (Anger et al., 2013) (Fig.25A).

En los ensayos de crosslink por luz UV se observa que RPS25 se entrecruzó con las sondas D3 y Bucle C (Fig.25B). Por el contrario, Rack1 es capaz de unir a todos los transcritos del dominio 3 (Fig.25C). Al silenciar estas proteínas mediante siRNAs en células HEK293 (Fig.25D) seguido de transfección con el plásmido bicistrónico, observamos que la reducción de los niveles de Rack1 provocó una estimulación de la traducción IRES-dependiente (Fig.25E), mientras que la de RPS25 no tuvo influencia.

Estos datos sugieren que la interacción entre el IRES de FMDV y el ribosoma puede estar mediada por estas proteínas, pero que al contrario que sucede para otros virus RNA

RESULTADOS

(Hertz et al., 2013), no son fundamentales en el proceso. De hecho parece que Rack1 ejerce un efecto represor sobre el mismo, bien de manera directa o bien a través de alguna de las rutas de señalización en la que está implicado.

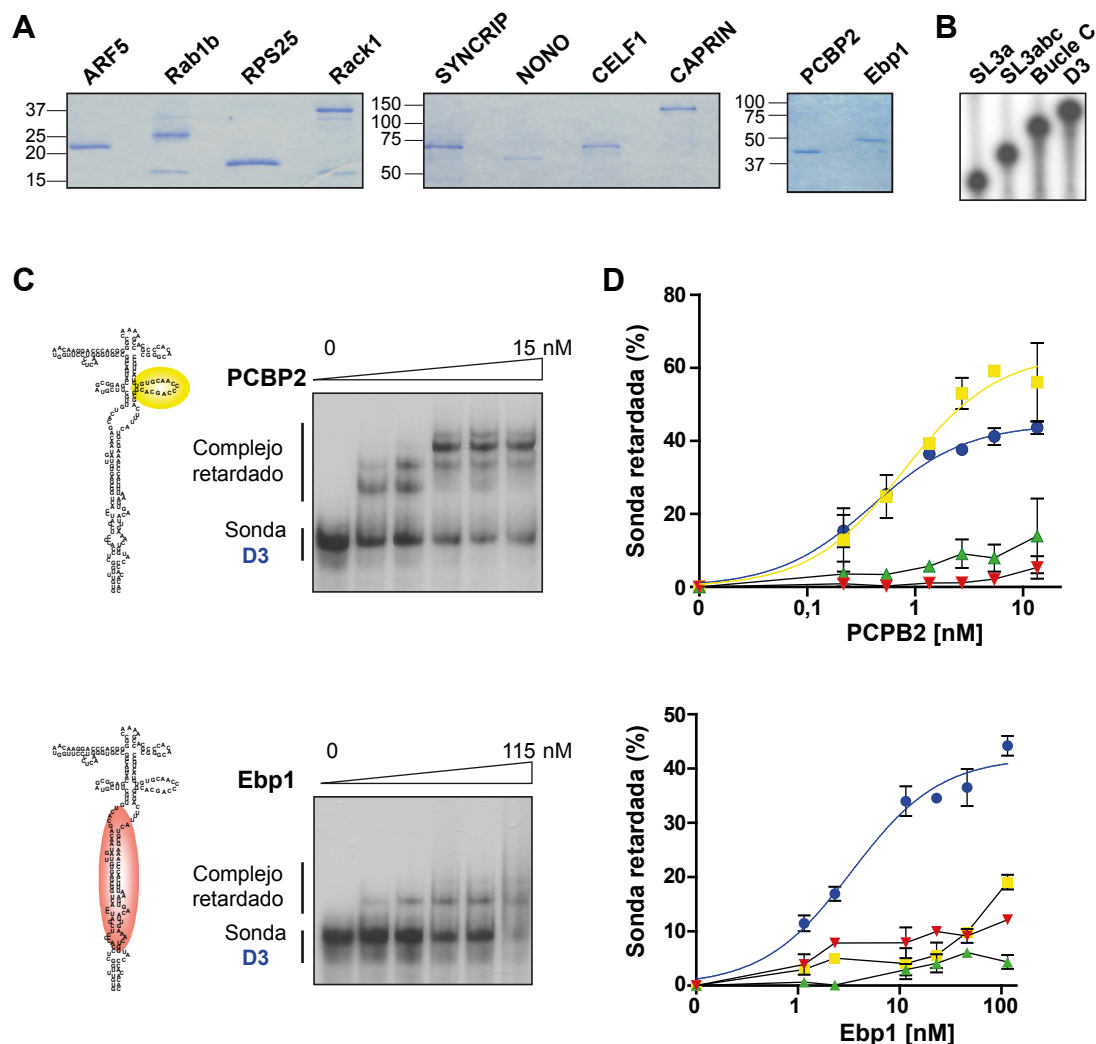


Figura 24. Proteínas purificadas y sondas utilizadas para la validación de las interacciones proteína-RNA. (A) Imagen de geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie representativos de la movilidad electroforética de las proteínas purificadas. **(B)** Autorradiografía de un gel desnaturalizante cargado con las sondas de los subdominios del D3 marcadas uniformemente con P32. **(C)** Interacción de PCBP2 y Ebp1 con D3. Autorradiografía de ensayos de retardo en gel realizados con cantidades crecientes de PCBP2 o Ebp1 y RNA D3, resuelto en geles nativos. **(D)** Representación gráfica del porcentaje de sonda retardada frente a la cantidad de PCBP2 o Ebp1, relativo a la sonda libre en ausencia de proteína. Se muestra el ajuste a la curva de afinidad.

2.6. Nuevas proteínas de unión a RNA

En este apartado centramos nuestra atención en las proteínas Rab1b y ARF5, cuya capacidad de unir RNA era desconocida. Rab1b es una proteína de 201 aminoácidos que contiene un dominio de actividad RAB (Fig.26A), que da nombre a esta familia. Las proteínas Rab actúan como interruptores moleculares alternando entre una forma activa, unida a GTP y

una inactiva, unida a GDP (Park, 2013). Rab1b, junto con Rab1a (con la que tiene una homología en secuencia en torno al 90%), son proteínas implicadas en las etapas tempranas de los procesos de secreción y son esenciales para el transporte entre ER y el *cis*-Golgi (Plutner et al., 1991).

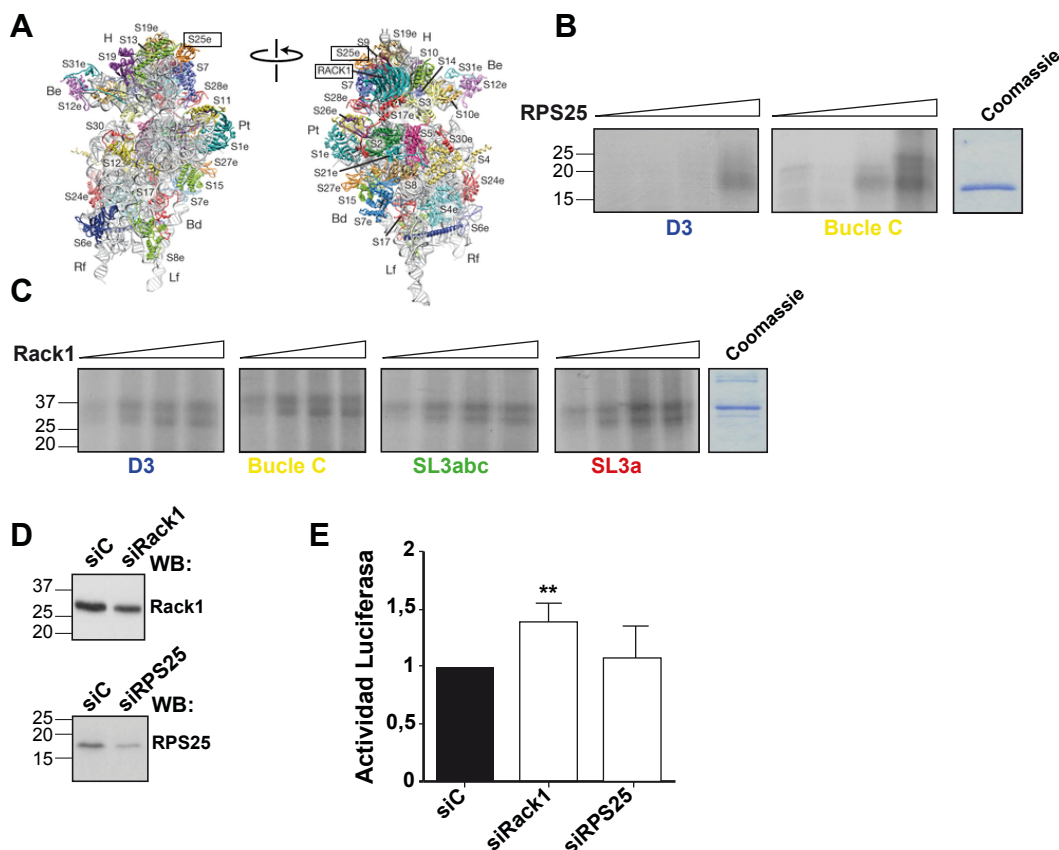


Figura 25. Las proteínas ribosomales RPS25 y Rack1 se asocian al D3. (A) Mapa de la subunidad menor del ribosoma Homo Sapiens con la localización de RPS25 y Rack1 (Anger et al., 2013). Autorradiografía del ensayo de crosslink por luz UV con cantidades crecientes de las proteínas RPS25 (2,5 a 50 ng) (B) y Rack1 (25 a 500 ng) (C) y una cantidad constante de la sonda indicada, resuelto mediante SDS-PAGE. La movilidad de la proteína se muestra a la derecha (tinción con azul de Coomassie). (D) WB de la depleción mediante siRNAs de Rack1, RPS25 o siRNA control (siC) en células HEK293. (E) Efecto de la depleción de las proteínas Rack1 y RPS25 sobre la actividad IRES. La actividad luciferasa del plásmido bicistrónico transfectado se determinó después de transfectar los siRNAs 30 h antes. El efecto sobre la síntesis de proteínas se calculó respecto al siRNA control. Cada experimento se repitió tres veces. Los valores representan la media \pm SD (** $P < 0,005$).

Estudios de afinidad a RNA en geles nativos mostraron la formación de un complejo retardado con todas las sondas (Fig.26B). Los valores de constante de disociación son similares para las sondas D3 (1,8 nM), Bucle C (1,4 nM) y SL3abc (1,8 nM) y mucho menores para SL3a. Estos datos se confirmaron mediante ensayos de crosslink por luz UV. Se observó una banda con la misma movilidad que Rab1b purificada en presencia de las sondas D3, Bucle C y SL3abc (Fig.26C), pero no con SL3a. Este dato demuestra que Rab1b es capaz de unir de manera directa al dominio 3 del IRES, pero no al motivo estructural del brazo 3a.

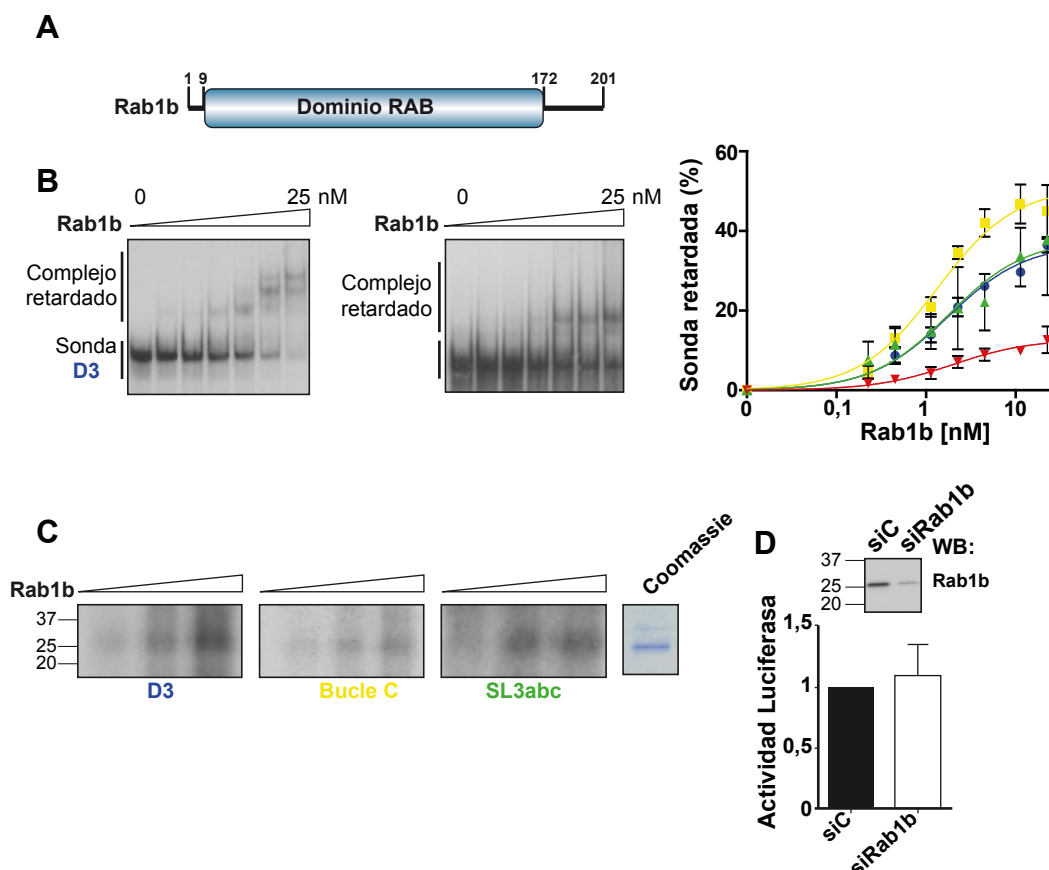


Figura 26. Rab1b se asocia directamente al subdominio SL3abc. (A) Representación esquemática de Rab1b, indicando la localización de su dominio de actividad RAB. Los números indican la posición de los aminoácidos. (B) Autorradiografías de ensayos de retardo en gel con cantidades crecientes de Rab1b y sondas de los subdominios del dominio 3 resueltos en geles nativos. Se determinó el porcentaje de sonda retardada en cada caso respecto a la sonda en ausencia de proteína; cada experimento se repitió tres veces. Los valores representan la media \pm SD. Se determinó el ajuste a la curva de afinidad con los valores obtenidos para cada sonda. (C) Autorradiografía del ensayo de crosslink por luz UV con cantidades crecientes de Rab1b (25 a 200 ng) y una cantidad fija de la sonda indicada en cada caso, resueltos mediante SDS-PAGE. La movilidad de la proteína se muestra a la derecha mediante tinción con azul de Coomassie. (D) Efecto de la depleción de Rab1b mediante siRNA en células HEK293 sobre la traducción dependiente de IRES, respecto a las células tratadas con el siRNA control (siC). Los valores representan la media de tres experimentos \pm SD.

Para analizar si la unión de Rab1b al dominio 3 tenía alguna repercusión en la actividad del IRES llevamos a cabo la depleción de la proteína mediante siRNA en células HEK293 (Fig.26D), seguido de transfección del plásmido bicistrónico que contiene el IRES de FMDV. La medida de luciferasa de tres ensayos independientes reveló que la ausencia de Rab1b no modifica la traducción IRES-dependiente (Fig.26E). Estos ensayos, por tanto, sugieren que Rab1b es una proteína capaz de unir directamente el dominio 3 del IRES, pero que no está implicada en la regulación de su actividad.

ARF5 es una proteína de unión a nucleótidos de guanina de bajo peso molecular (p23). Pertenece a la familia ARFs, formado por seis miembros divididos en tres clases, I (ARF 1,2 y 3), II (ARF4 y 5) y III (ARF6), que controlan el tráfico de membrana y la estructura

de orgánulos a través de cambios en su estado de activación, asociado a la unión de GTP o GDP (Jackson and Bouvet, 2014) (Fig.7).

Los ensayos de afinidad a RNA de ARF5 mostraron que la proteína purificada interacciona de manera directa con todos los transcritos del dominio 3, formando dos complejos de distinta movilidad con las sondas D3, Bucle C y SL3a (Fig.27A). El complejo retardado aparece a menores concentraciones de proteínas con el subdominio Bucle C que con los subdominios SL3abc y SL3a. La sonda D3 es la que muestra menos afinidad por la proteína, ya que los retardos se observan a las mayores cantidades de proteína. La depleción de la proteína mediante siRNA en células HEK293 (Fig.27B) y posterior transfección del plásmido bicistrónico mostraron un aumento de la actividad de la proteína reportera (Fig.27C). Este resultado sugiere que ARF5 reprime la actividad IRES.

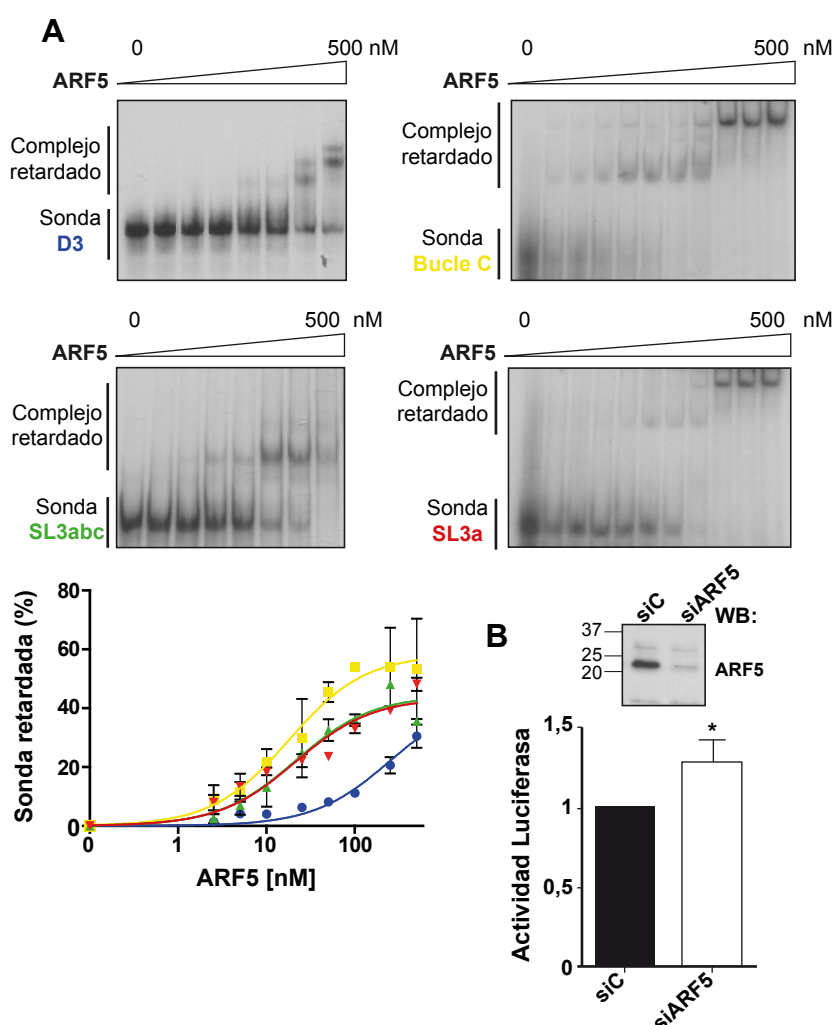


Figura 27. ARF5 se asocia a todos los subdominios del D3 y reprime la actividad IRES. (A) Autorradiografía de ensayos de retardo en gel con cantidades crecientes de ARF5 purificada y sondas de los subdominios del dominio 3, resueltos en geles nativos. Se determinó el porcentaje de sonda retardada en cada caso, respecto a la sonda en ausencia de proteína; cada experimento se repitió tres veces. Los puntos representan la media \pm SD. Se determinó el ajuste a la curva de afinidad con los valores obtenidos para cada sonda. **(B)** Depleción de ARF5 mediante siRNA en células HEK293. Análisis del efecto sobre la traducción dependiente de IRES respecto a las células tratadas con el siRNA control (siC). Los valores representan la media de tres experimentos \pm SD (* $P < 0,01$).

2.7. RBPs como nuevos factores asociados al dominio 3

Además de identificar nuevas proteínas de unión a RNA y estudiar su posible influencia en la actividad IRES, hemos seleccionado algunas proteínas cuya capacidad de unir RNA es conocida, pero que, sin embargo, aún no había sido descrita su capacidad de unir al IRES de FMDV. SYNCRIP (hnRNPQ), que se identificó con los subdominios D3 y SL3a, es un factor de splicing (Mourelatos et al., 2001). Contiene tres RRM's flanqueados por un extremo N-terminal ácido y un extremo C-terminal con tramos ricos en el motivo RGG (Fig.28A).

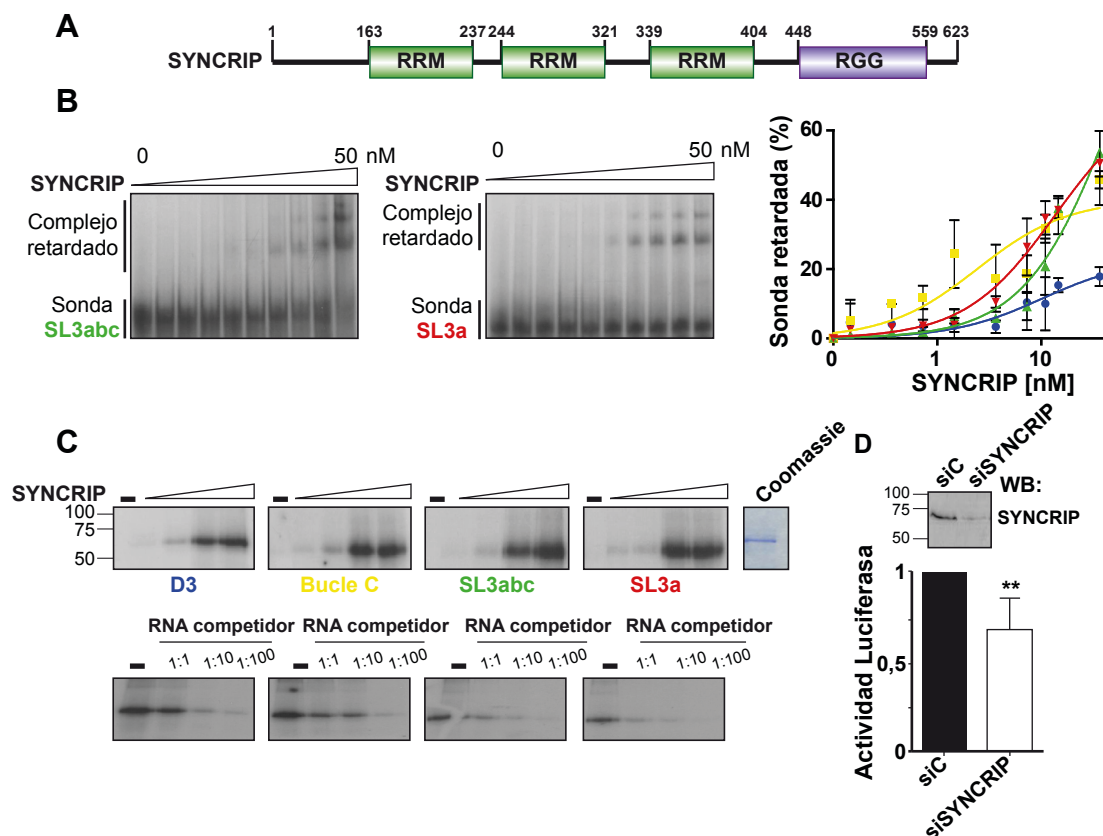


Figura 28. SYNCRIP se asocia preferentemente al subdominio SL3a y activa la traducción dependiente de IRES. (A) Representación esquemática de SYNCRIP, indicando la localización de sus dominios RRM y RGG. Los números indican la posición de los aminoácidos. (B) Autorradiografía de ensayos representativos de retardo en gel con cantidades crecientes de SYNCRIP y sondas de los subdominios del dominio 3, resueltos en geles nativos. Se determinó el porcentaje de sonda retardada en cada caso, respecto a la sonda en ausencia de proteína; cada experimento se repitió tres veces. Los puntos representan la media \pm SD. Se determinó la curva de afinidad con los valores obtenidos para cada sonda. (C) Autorradiografía del ensayo de crosslink por luz UV con cantidades crecientes (5 a 50 ng) de SYNCRIP purificada y una cantidad fija de la sonda indicada en cada caso, resueltos mediante SDS-PAGE (parte superior). La movilidad de la proteína se muestra a la derecha mediante tinción con azul de Coomassie. Autorradiografía del ensayo de competición de la unión de SYNCRIP a las sondas en presencia de cantidades crecientes de RNA citoplásmico (parte inferior). (D) Depleción de SYNCRIP mediante siRNA en células HEK293. Análisis del efecto sobre la traducción dependiente de IRES respecto a las células tratadas con el siRNA control (siC). Los valores representan la media de tres experimentos \pm SD (**P>0,005).

En ensayos de retardo en gel, la proteína presenta una afinidad similar para las sondas Bucle C, SL3abc y SL3a, mayor que la observada para la sonda D3 (Fig.28B). Los ensayos de crosslink por luz UV entre la proteína purificada y las sondas del dominio 3 mostraron que existe una interacción directa y dependiente de dosis entre SYNCRIP y cada uno de ellos (Fig.28C, línea superior). Esta unión es competida al añadir RNA citosólico, a partir de la proporción molar 1:1 en el caso de SL3a y SL3abc, 1:10 para el D3 y 1:100 para el Bucle C (Fig.28C, línea inferior), revelando mayor afinidad por el subdominio Bucle C. La actividad luciferasa observada en células HEK293 transfectadas con el plásmido bicistrónico a las que se le había deplecionado SYNCRIP mediante siRNAs (Fig.28D) disminuye respecto a las células tratadas con el siRNA control (Fig.28E). Esto indica que SYNCRIP estimula la traducción dirigida por el IRES de FMDV.

Celf1 es una proteína de unión a RNA muy conservada que controla splicing, deadenilación y estabilidad de mRNA, así como traducción (Dasgupta and Ladd, 2012). Posee tres RRM, dos en el extremo N-terminal y uno en el extremo C-terminal (Fig.29A). El motivo que reconoce la proteína son regiones ricas en GU, pero los dos primeros RRM también reconocen el triplete CUG (Edwards et al., 2011).

Las bandas observadas a la altura de la proteína purificada en los ensayos de interacción con luz UV muestran que interacciona con todos los transcritos del dominio 3 (Fig.29B, línea superior) de modo dependiente de dosis. Teniendo en cuenta que los ensayos se realizaron en paralelo y con la misma cantidad de proteína purificada, se deduce que la proteína tiene mayor afinidad por el subdominio D3. El RNA citosólico compite la unión con los subdominios D3 y Bucle C al añadir un exceso molar 1:100. Para las sondas SL3abc y SL3a, una proporción 1:10 compite casi por completo la interacción (Fig.29B, línea inferior).

Para entender estos resultados analizamos la secuencia primaria del dominio 3 en busca de posibles sitios de unión de Celf1 (Fig.29C). Si bien la secuencia óptima de reconocimiento de la proteína (UGUUUUGU) no existe en el dominio 3, existen tres tripletes UGU (Fig.29C, cuadros rojos), reconocidos por sus dominios RRM y cuatro tripletes CUG (cuadros morados) reconocidos por RRM1 y RRM2, en la región basal del dominio 3, que podrían explicar la afinidad de la proteína por la sonda D3. La presencia de otra región rica en UGU en el bucle rico en C, y un tramo rico en U y G (cuadro amarillo) en el bucle opuesto pueden estar implicados en la unión de Celf1 al transcrito Bucle C. Por último, el brazo del stem-loop 3a contiene una zona rica en G y U, aunque sin ningún triplete UGU o CUG, lo que podría explicar la menor afinidad de la proteína por los fragmentos SL3abc y SL3a. Sin embargo, la proteína no parece afectar a la traducción mediada por el IRES, ya que la actividad luciferasa no se ve alterada al transfectar el plásmido bicistrónico en células HEK293 deplecionadas de Celf1 (Fig.29D-E).

La proteína NONO, pertenece a la familia de proteínas *Drosophila behavior/ human splicing* (DBHS), junto con SFPQ y PSPC1 (Knott et al., 2016). Se caracterizan por tener en el extremo N-terminal un tándem conservado de motivos RRM y un extremo C-terminal tipo “coiled-coil” (CC) (Fig.30A). Los resultados observados en los ensayos de crosslink por luz UV realizados con la proteína purificada demuestran que interacciona con todos los transcritos (Fig.30B parte superior). Esta interacción está saturada desde cantidades de proteína

RESULTADOS

bajas (10 ng) y no se observó variación al aumentar la cantidad de proteína. Al añadir RNA citosólico como competidor sobre el ensayo de entrecruzamiento usando 10 ng de NONO, se observó una disminución de la banda de la proteína purificada para todos los subdominios del dominio 3 (Fig.30B, parte inferior), sugiriendo una afinidad similar de la proteína por todos ellos.

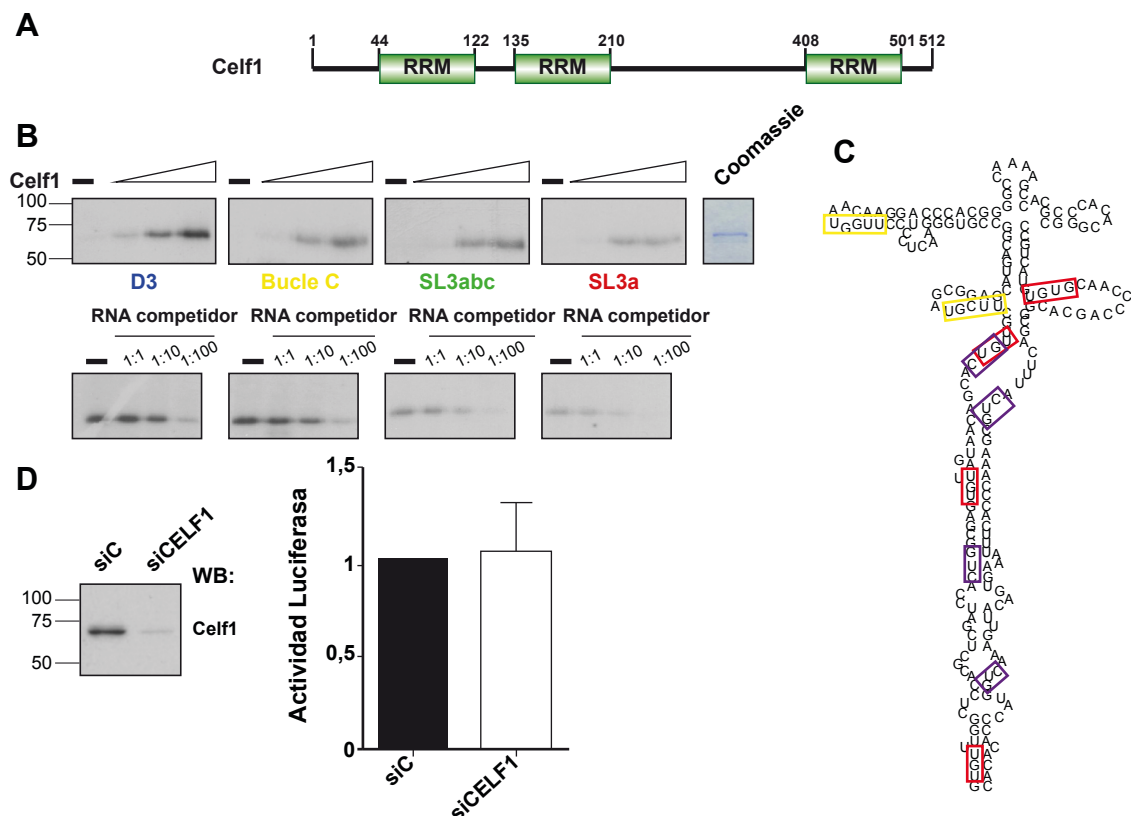


Figura 29. Celf1 se asocia preferentemente a los transcritos D3 y Bucle C. (A) Representación esquemática de Celf1, indicando la localización de sus dominios RRM. Los números indican la posición de los aminoácidos. (B) Autorradiografía del ensayo de crosslink por luz UV con cantidades crecientes (1 a 10 ng) de Celf1 purificada y una cantidad fija de la sonda indicada, resueltos mediante SDS-PAGE (parte superior). La movilidad de la proteína se muestra a la derecha mediante tinción con azul de Coomassie. Autorradiografía del ensayo de competición de la unión de Celf1 a las sondas en presencia de cantidades crecientes de RNA citoplásmico (parte inferior). (C) Posibles secuencias de nucleótidos reconocidos por Celf1 en el dominio 3 cuadros rojos (UGU), amarillos (tramos ricos en U y G) o morados (CUG)). (D) Depleción de Celf1 mediante siRNA en células HEK293. Análisis del efecto sobre la traducción dependiente de IRES respecto a las células tratadas con el siRNA control (siC). Los valores representan la media de tres experimentos \pm SD.

Por último, analizamos la proteína Caprin1, una fosfoproteína citoplasmática muy conservada de 709 aminoácidos, que contiene en su región N-terminal un plegamiento tipo CC y en su extremo C-terminal tres motivos RGG (Thandapani et al., 2013) (Fig.30C). Los ensayos realizados para estudiar la interacción RNA-proteína usando Caprin1 purificada y RNA uniformemente marcado con P^{32} mostraron que Caprin1 tiene una afinidad similar por los distintos transcritos del dominio 3 (Fig.30D), independiente de la cantidad de proteína empleada. Además, al competir esa unión con cantidades crecientes de RNA

citoplásmico se observó un comportamiento semejante para los transcritos, desplazándose la unión a partir de la proporción molar 1:10. Estos datos sugieren que Caprin1 es capaz de interactuar indistintamente con todos los subdominios del dominio 3 del IRES.

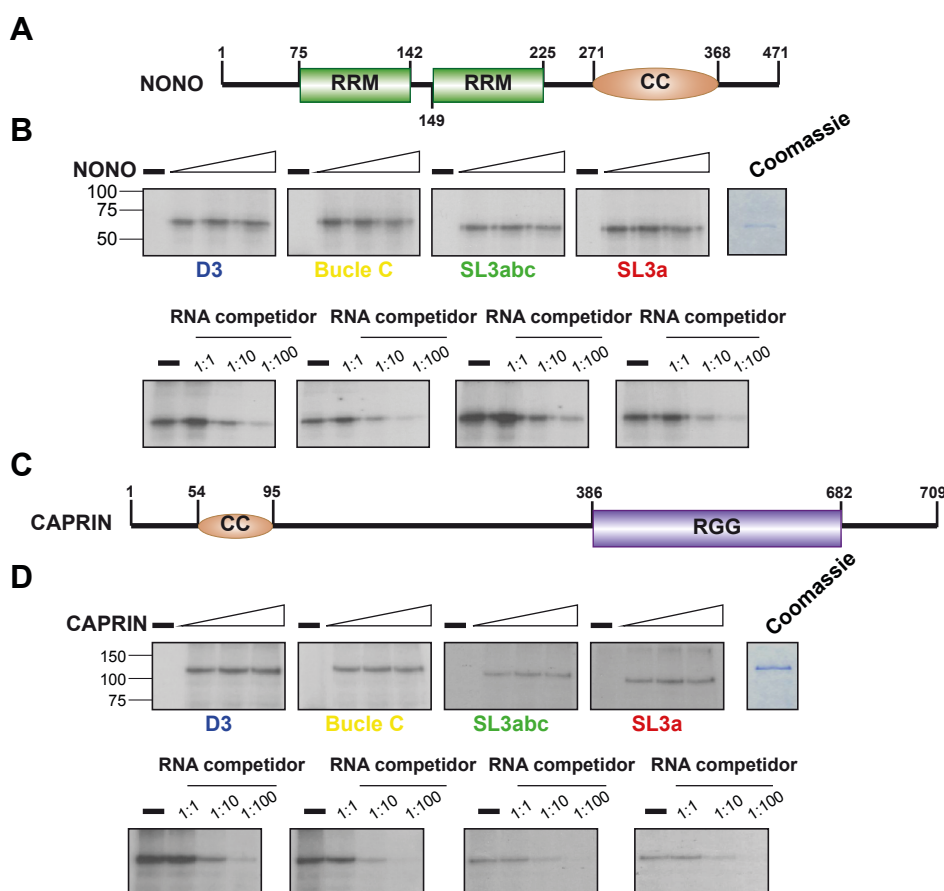


Figura 30. NONO y Caprin se asocian a todos los subdominios del dominio 3. (A) Representación esquemática de NONO, indicando la localización de sus dominios RRM y el motivo coiled-coil (CC). Los números indican la posición de los aminoácidos. (B) Autorradiografía del ensayo de crosslink por luz UV con cantidades crecientes (10 a 100 ng) de NONO y una cantidad fija de la sonda indicada, resueltos mediante SDS-PAGE (parte superior). La movilidad de la proteína se muestra a la derecha mediante tinción con azul de Coomassie. Autorradiografía del ensayo de competición de la unión de NONO a las sondas en presencia de cantidades crecientes de RNA citoplásmico (parte inferior). (C) Representación esquemática de Caprin, indicando la localización de su motivo coiled-coil (CC) y RGG. Los números indican la posición de los aminoácidos. (D) Autorradiografía del ensayo de crosslink por luz UV con cantidades crecientes (10 a 100 ng) de Caprin y una cantidad fija de la sonda indicada, resueltos mediante SDS-PAGE (parte superior). La movilidad de la proteína se muestra a la derecha mediante tinción con azul de Coomassie. Autorradiografía del ensayo de competición de la unión de Caprin a las sondas en presencia de cantidades crecientes de RNA citoplásmico resuelto en geles SDS-PAGE (parte inferior).

En resumen, proteínas cuya capacidad de unir al RNA ya se había descrito, como SYNCRIP, Celf1, NONO o Caprin1, son capaces de unir al IRES de FMDV. SYNCRIP muestra una afinidad mayor por el subdominio bucle C, mientras que Celf1 se une con más afinidad a la región basal del IRES (Bucle C y D3). Por último, NONO y Caprin1 muestran una afinidad similar por todos los subdominios del dominio 3, puesto que no se detectó un aumento de la intensidad de las bandas de entrecruzamiento dependiente de la cantidad

RESULTADOS

de proteína, y la competición con RNA citosólico que se obtuvo con la cantidad menor de proteína empleada (10 ng) fue similar para todos los subdominios. Los datos obtenidos mediante ensayos de retardo en gel con las proteínas Celf1, NONO o Caprin no nos permitieron obtener conclusiones debido a la formación de agregados de alto peso molecular con los distintos subdominios que se quedaban retenidos en el pocillo, impidiendo que se pudieran resolver en geles nativos. Finalmente, SYNCRIP estimuló la traducción dependiente de IRES, mientras que la depleción de Celf1 no afectó.

Hemos purificado proteínas asociadas a RNAs que contienen motivos estructurales esenciales para la actividad IRES y las hemos analizado mediante espectrometría de masas. Con este abordaje se han identificado proteínas con diversas funciones, algunas de las cuales (traducción, splicing o estabilidad del RNA) ya se habían asociado al IRES. Además, se han identificado proteínas implicadas en procesos celulares, como el transporte de proteínas entre orgánulos, cuya asociación con el elemento IRES es muy novedosa e inesperada.

La validación funcional de alguna de las proteínas identificadas ha descrito nuevas proteínas con capacidad para unir RNA, como ARF5 o Rab1b, además de RBPs cuya asociación al IRES de FMDV no se había probado con anterioridad, como SYNCRIP, Celf1, NONO o Caprin1. De estas proteínas, solo ARF5 y SYNCRIP afectan a la actividad IRES. En concreto, ARF5 se comporta como un represor, mientras que SYNCRIP tiene un efecto estimulador.

3. Proteínas asociadas diferencialmente al IRES de FMDV *in vivo*

Para identificar nuevos factores que estuvieran asociados con el IRES en el contexto celular, aplicamos un abordaje que implica RNAs etiquetados expresados en células seguido de un análisis SILAC (Fig.31). Debido a que el objeto de estudio son las proteínas que reconocen el IRES en el contexto de un RNA funcional, se acopló una secuencia en la región 3'-NTR del mRNA que al transcribirse forma seis horquillas reconocidas por la proteína de la cápsida del fago MS2 (Keryer-Bibens et al., 2008). En este sistema, MS2 captura el RNA con gran afinidad y con él, co-purifican las proteínas celulares asociadas diferencialmente (Tsai et al., 2011).

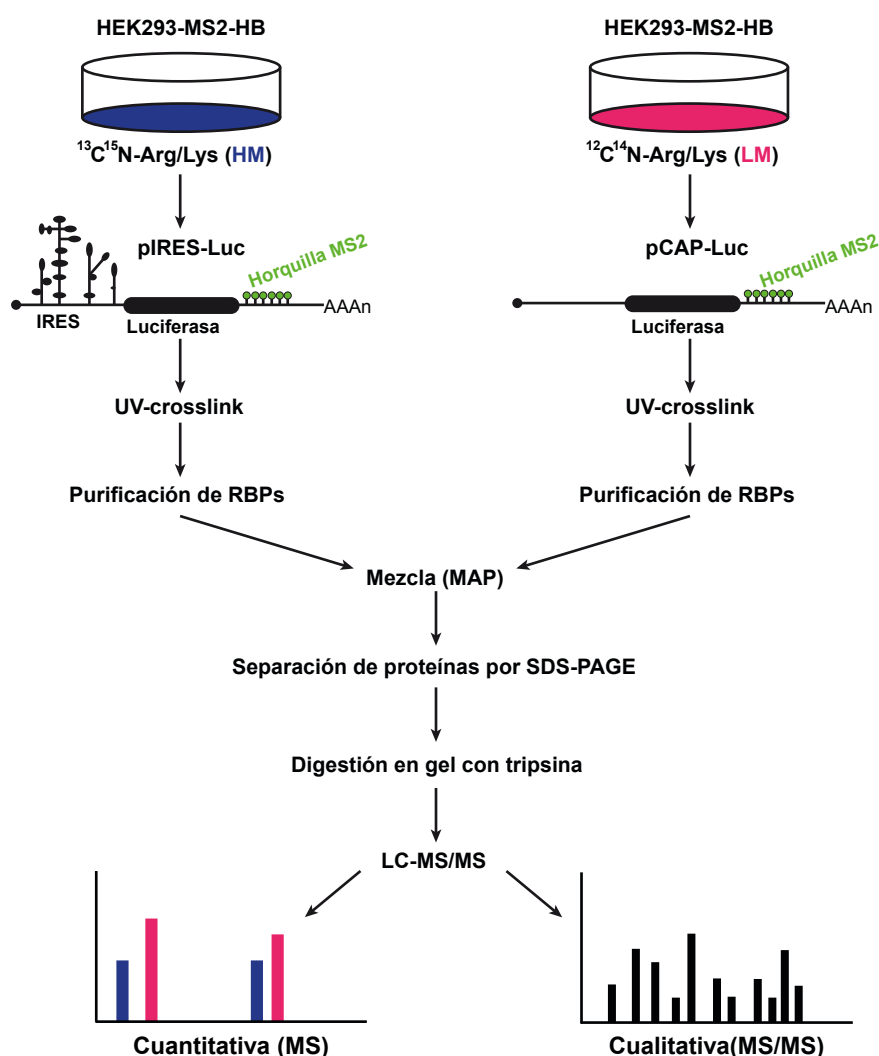


Figura 31. Purificación de RBPs unidas a RNAs etiquetados con horquillas reconocidas por la proteína MS2. Flujo de trabajo para la identificación y cuantificación por SILAC de las proteínas que se asocian a un RNA que contiene el IRES de FMDV (pIRES-Luc) frente a uno que no lo contiene (pCAP-Luc). La purificación de las RBPs se realizó por separado (Mix After Purification, MAP) y luego se mezclaron para el análisis por espectrometría de masas.

RESULTADOS

La metodología del SILAC consiste en el marcaje diferencial de las células con aminoácidos que contienen isótopos pesados estables. El análisis mediante espectrometría de masas en paralelo de la muestra con aminoácidos ligeros y pesados da lugar a un desplazamiento en los picos correspondientes al mismo péptido. La comparación entre las áreas de las parejas de picos proporciona información cuantitativa sobre las proteínas específicamente enriquecidas al purificar el RNA etiquetado que contiene el IRES frente a otro RNA que no lo tiene.

Se realizó el marcaje de una de las dos condiciones con $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Arg/Lys, dado que la digestión con tripsina de las proteínas en péptidos corta tras esos aminoácidos, asegurando que todos los péptidos estén marcados (Olsen et al., 2004). Tras permitir siete duplicaciones de las células en medio pesado o ligero, se transfectaron monocapas de células HEK293-MS2-HB con los plásmidos pIRES-luc o pCap-luc, respectivamente (Fig.31). Decidimos llevar a cabo la purificación de las proteínas asociadas a los RNAs pIRES-luc y p-CAP-luc, a través de su interacción con MS2-HB, por separado en cada muestra y luego mezclarlas para el análisis por espectrometría de masas (Mix after purification, MAP) (Fig.31). Este abordaje permite identificar todas las interacciones RNA-proteína, incluidas las más lábiles, ya que no se produce intercambio de proteínas y facilita que las purificaciones se lleven a cabo las condiciones óptimas con mayor cantidad de lisado (Wang and Huang, 2008). Se llevaron a cabo dos ensayos independientes con marcas cruzadas y solo tuvimos en cuenta las proteínas identificadas en los dos ensayos.

El plásmido MS2-HB codifica un dímero de la proteína MS2 seguido de la etiqueta Histidina-Biotina (HB) (Fig.32A). La proteína de la cápsida del bacteriófago MS2/R17 es útil para la purificación (Bardwell and Wickens 1990) o localización (Bertrand et al., 1998) del RNA. MS2 una proteína pequeña (13,7 kDa) que forma un dímero, con orientación cabeza-cola y reconoce con alta afinidad una sola molécula de RNA a través de una horquilla específica (Carey et al., 1983). La etiqueta HB proporciona una señal de biotilización *in vivo* y una secuencia de reconocimiento por la proteasa del virus del mosaico del tabaco (TEV) flanqueado por dos sextetes de histidinas (His6x-TEV-Bio-His6x) (Fig.32A). Este sistema permite purificaciones en dos etapas en presencia de urea (Guerrero et al., 2006; Tagwerker et al., 2006); tanto la unión de histidinas a las resinas de Ni^{2+} como la de biotina a estreptavidina es resistente este tratamiento. En nuestro caso, permite la purificación del dímero de MS2 unido al RNA de interés y por ello, a las proteínas que co-precipitan con él.

Para tener una expresión uniforme de la proteína MS2 durante todos experimentos, generamos líneas celulares que expresaran de manera estable la construcción MS2-HB. La presencia de la proteína MS2-HB en las células se analizó por WB con anticuerpo antibiotina (Fig.32A). Se observó una banda de $\approx 40\text{kDa}$ que coincide en todos los clones seleccionados, así como en un lisado celular obtenido en una expresión transitoria de la proteína (control positivo). De los clones analizados, seleccionamos el clon 7 para llevar a cabo los ensayos de SILAC (Fig.32A).

Dado que los plásmidos pIRES-luc y pCap-luc contienen la ORF del gen reportero luciferasa se determinó su eficiencia de traducción en las células HEK293-MS2-HB 24 h después de haber sido transfectados. El RNA derivado de pCAP-luc se tradujo más efi-

cientemente que el de pIRES-luc, y a su vez, la traducción de los dos transcritos fue más eficiente que la del RNA del pBIC (Fig.32B).

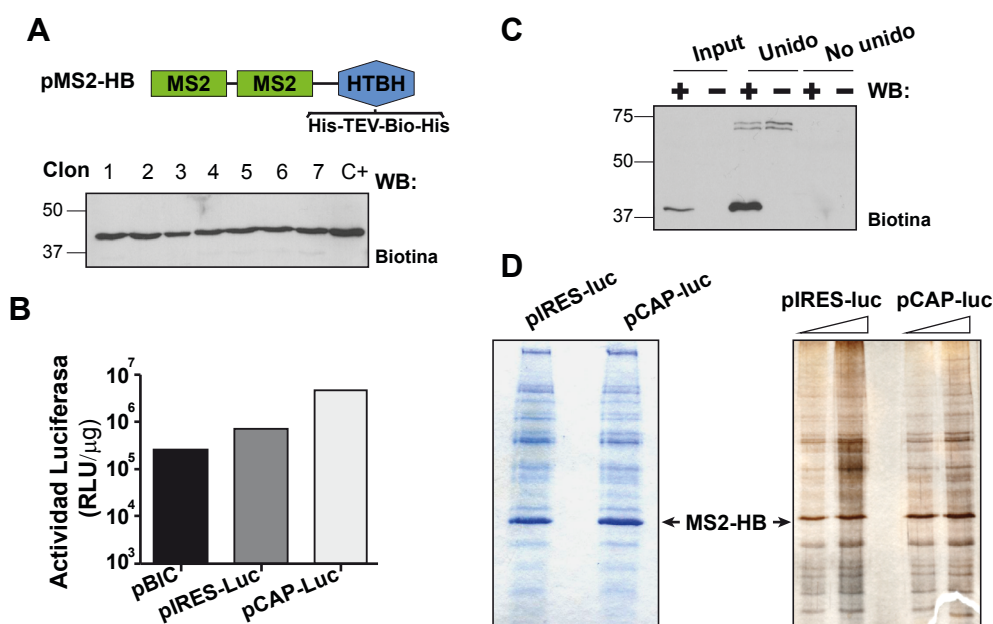


Figura 32. Herramientas para el ensayo SILAC. (A) Clones celulares HEK293 (1 al 7) que expresan establemente la proteína pMS2-HB. WB de lisados celulares con anticuerpos anti-biotina. Como control positivo (C+) se empleó el lisado de una transfección transitoria de pMS2-HB en células HEK293. **(B)** Actividad Luciferasa de los RNAs pIRES-Luc y pCAP-Luc en células HEK293-MS2-HB, relativo al plásmido pBIC. **(C)** WB con anti-biotina de la purificación de MS2-HB del lisado del clon 7 mediante bolas magnéticas recubiertas de estreptavidina. Como control negativo (-) se empleó un lisado de células HEK293. **(D)** SDS-PAGE, teñido con azul de Coomassie o plata, cargado con las proteínas asociadas a los RNAs pIRES-Luc y pCAP-Luc en HEK293-MS2-HB. Se indica la movilidad del polipéptido MS2-HB.

3.1. Purificación de proteínas asociadas al IRES de FMDV

Se transfectó el clon 7 de células HEK293-MS2-HB con los plásmidos pIRES-Luc y pCap-Luc; 30 horas después se irradió con luz UV las monocapas para estabilizar las interacciones RNA-proteína. Posteriormente, se lisaron las células y se purificaron los RNAs etiquetados con las horquillas que reconoce la proteína MS2. La eficiencia de la purificación se analizó por WB usando anticuerpos antibiotina. Como se muestra en la Fig.32C, se logró una recuperación muy eficiente de la proteína MS2-HB, dado que no aparece ninguna banda a la altura de 40 kDa en las fracciones correspondientes a la muestra no unida. Como control negativo se usaron células HEK293 que no expresan la proteína de fusión MS2. Las bandas observadas con una movilidad de ≈ 75 kDa corresponden a proteínas biotiniladas de forma constitutiva en las células, que se purifican tanto en la muestra problema como en el control.

Se llevó a cabo un análisis de las proteínas purificadas por electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE y tinción tanto por Coomassie como por plata (Fig.32D, izquierda y derecha, respectivamente). La proteína MS2-HB se observó en todos los lisados como la proteína más intensa. Además, se observó un patrón amplio de proteínas, similar entre los dos tipos

RESULTADOS

de muestras, IRES-Luc y cap-Luc. Para obtener una imagen cuantitativa de factores que actúan en la traducción dependiente de IRES sobre la dependiente de cap, recurrimos a un estudio de espectrometría de masas cuantitativo.

3.2. Identificación de proteínas asociadas diferencialmente al IRES de FMDV

Mientras que en la proteómica cualitativa se analizan las proteínas identificadas mediante el número de péptidos y la puntuación de su identificación, en la proteómica cuantitativa se compara el área de los picos de péptidos obtenidos de las condiciones marcadas con aminoácidos pesados frente a los ligeros. De esta manera, se obtiene una proporción entre las proteínas identificadas en las condiciones de medio pesado y medio ligero ($\text{Log}_2(\text{Cap}/\text{IRES})$). La proteína de fusión MS2-HB sirve para normalizar las proporciones obtenidas (valor 0), debido a que es el anzuelo con el que se han llevado a cabo las purificaciones y a su presencia constitutiva en las células HEK293-MS2-HB. El espectro de masas de uno de los péptidos correspondientes a la proteína MS2-HB mostró un desplazamiento del doblete debido a la marca con aminoácidos pesados, mientras que las áreas bajo los picos fueron similares (Fig.33A). Después de normalizar con la proteína MS2-HB, las proteínas con un valor negativo de $\text{Log}_2(\text{Cap}/\text{IRES})$ corresponden a factores asociados diferencialmente al RNA que contiene el IRES (Fig.33B).

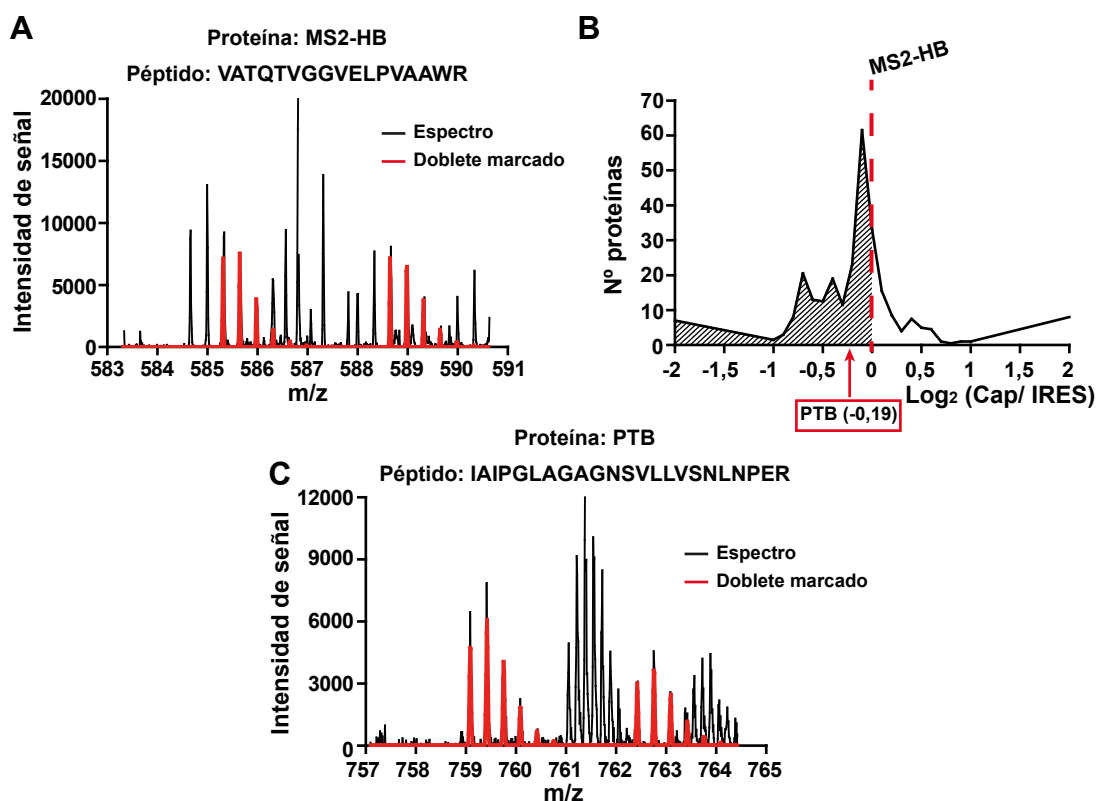


Figura 33. Proteínas asociadas diferencialmente al RNA que contiene el IRES. (A) Espectro de masas de un péptido representativo de la construcción MS2-HB. En rojo se muestra el desplazamiento del doblete marcado con isótopos estables pesados. (B) Distribución de las proteínas identificadas en función de su proporción Cap/IRES, representada como $\text{Log}_2(\text{Cap}/\text{IRES})$. Se indican la posición de la proteína MS2 y de PTB. (C) Espectro de masas de un péptido representativo de la proteína PTB. En rojo se destaca el desplazamiento del doblete marcado.

Un dato importante es el límite para el valor a partir del cual se considera que una proteína está enriquecida en una de las fracciones. Si bien se ha considerado ese valor como 1.5 (cuyo Log_2 sería 0.58), ese límite es empírico, debido a que proteínas con valores menores no se identificaron enriquecidas en publicaciones que pusieron a punto la metodología de SILAC en estudios del proteoma completo de levaduras (Guerrero et al., 2006). Debido a que nuestro trabajo pretendía analizar las proteínas asociadas a un RNA que comparte gran parte de la secuencia con el RNA control (unos 2000 nts de 2500 nts), decidimos seleccionar un límite que respondiera a parámetros específicos de nuestro abordaje experimental. Entre las proteínas identificadas detectamos varias proteínas que interaccionan con el IRES de FMDV. El factor con valor negativo menor de $\text{Log}_2(\text{Cap}/\text{IRES})$ cuya capacidad de unir al IRES ha sido descrito en numerosas publicaciones fue PTB (Fitzgerald and Semler, 2009). El espectro de masas para los polipéptidos reflejó un aumento de masa en uno de los dobletes marcados, debido a los aminoácidos que contenían isótopos estables pesados (Fig.33C). En el espectro mostrado para el péptido de PTB se observó una disminución del área bajo la curva del doblete pesado, dando un valor medio de $\text{Log}_2(\text{Cap}/\text{IRES})$ de -0.19. Por ello, se estableció este valor como límite para considerar a una proteína como enriquecida en el RNA que contiene el IRES (Fig.33B).

La distribución de las proteínas identificadas respecto al $\text{Log}_2(\text{Cap}/\text{IRES})$ muestra diferencias con la gráfica que se obtendría si se analizarán dos proteomas completos. Se observa una sobrerrepresentación de proteínas en la parte izquierda de la gráfica (Fig.33B), posiblemente debido a que la presencia del IRES provoca una interacción con mayor número de proteínas. También observamos que el valor 0, correspondiente a la proteína MS2-HB, no está centrado en el pico que representaría la mayor cantidad de proteínas en una distribución gaussiana de proteínas, presente en análisis de proteomas completos. Por el contrario, la proteína PTB aparece en el pico más representado, lo que indica que sirve como referencia del límite de confianza para seleccionar proteínas para su estudio posterior.

Para tener una imagen global de las proteínas asociadas diferencialmente al IRES recurrimos a la aplicación BinGO (Fig.34A). La distribución de las proteínas con valor negativo mayor que PTB en redes pone de manifiesto que la función mayoritaria de las proteínas identificadas es la traducción (Fig.34A), tanto por la aparición de la red de traducción como la de síntesis de aminoácidos y nucleótidos, con significatividad mayor que la observada para los subdominios del D3. También se observó una red de proteínas ribosomales, tanto de la subunidad pequeña como de la mayor, lo que concuerda con los datos obtenidos para el transcrito D3 (Fig.22D). De la misma manera aparece una red de proteínas implicadas en procesos del RNA. Esta observación indica que la función del IRES no está restringida al control de la traducción, como ya sugieren los datos del apartado 2.3.

Entre las proteínas identificadas asociadas diferencialmente al RNA que contiene el IRES aparecieron ITAFs ya descritos que nos sirvieron como control interno del abordaje experimental (Fig.34B, izquierda). Algunas de estas proteínas son Ebp1 (Pacheco and Martinez-Salas, 2010), G3BP, PCBP1-2 (Gamarnik and Andino, 2000), hnRNPU, A o K o DHX9 (Hartman et al., 2006).

RESULTADOS

Además, se identificaron RBPs que no se habían descrito como ligandos del IRES; por ejemplo PRPF19, o helicasas (como DDX50), lo que parece sugerir la implicación del elemento IRES en otros procesos, además de regular la traducción.

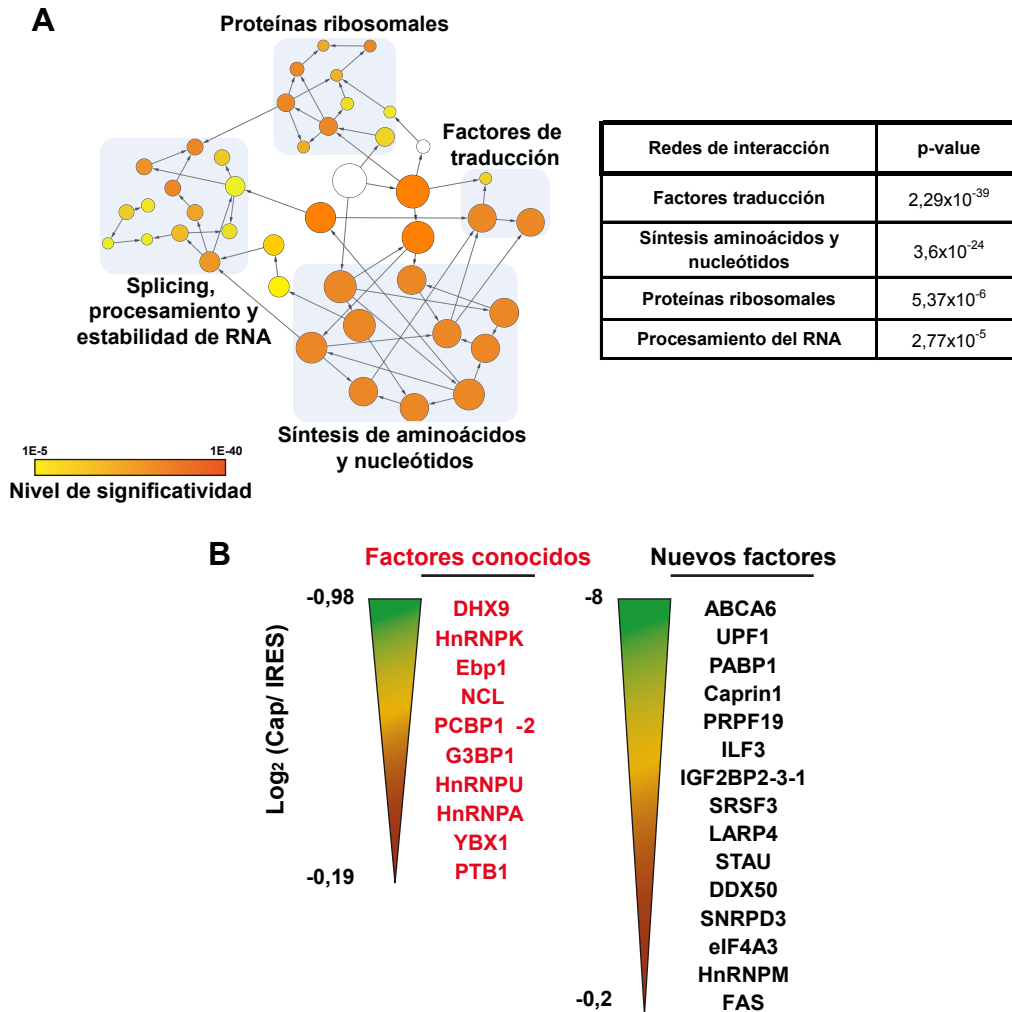


Figura 34. Análisis de las proteínas asociadas diferencialmente al RNA que contiene el IRES. (A) Redes funcionales analizadas con la aplicación BinGO de la plataforma Cytoscape. Las esferas representan nudos de proteínas relacionadas, su tamaño es proporcional al número de proteínas que lo componen y su color indica la significatividad de los mismos. En azul se destacan las redes funcionales, formadas por varios nudos relacionados. Las esferas blancas representan nudos creados para enlazar nudos estadísticamente significativos. Las flechas indican el sentido de las interacciones entre nudos. En la tabla se muestran los valores p-value medios para cada red funcional. **(B)** Proteínas asociadas al RNA que contiene el IRES. En rojo se indican proteínas descritas asociadas al IRES y en negro, nuevas proteínas identificadas en este estudio. Los números indican el intervalo de Log₂(Cap/IRES).

La comparación de las proteínas identificadas mediante SILAC con los ensayos de proteínas asociadas a los subdominios del dominio 3 mostró una coincidencia del 30% con D3 y Bucle C y del 10% con SL3abc y SL3a. Entre las proteínas identificadas en ambos estudios se encontraron Caprin 1, UPF1 o FAS con D3 y Bucle C; y el factor 3 de unión a interleuquina (ILF3) con SL3abc y SL3a. De todas las proteínas identificadas, elegimos UPF1 para validar su interacción con el IRES.

3.3 UPF1, una proteína de unión a RNA promiscua que interacciona con el IRES de FMDV

La proteína UPF1 obtuvo un valor medio de $\text{Log}_2(\text{Cap/IRES})$ de -0.474 (1.61 si revertimos el Log_2), no solo alejado del valor de PTB, sino también por encima del valor límite de 1.5, como muestra la diferencia de áreas bajo la curva observadas en el doblete desplazado del espectro de masa de uno de los péptidos obtenidos en la fragmentación de UPF1 (Fig.35A).

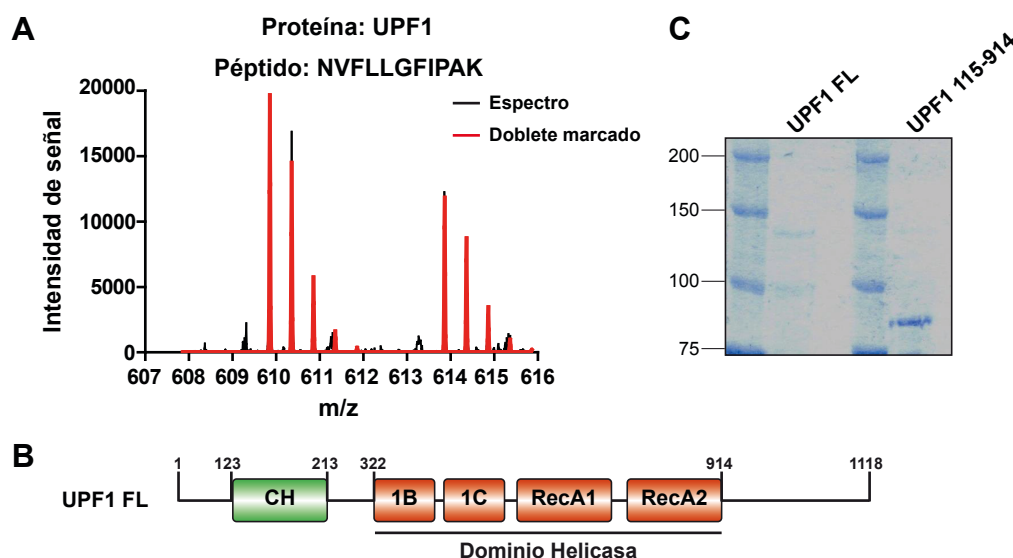


Figura 35. Identificación de UPF1 como un factor unido diferencialmente al RNA que contiene el IRES. (A) Espectro de masas de un péptido representativo de la proteína UPF1. En rojo se destaca el desplazamiento del doblete marcado. (B) Representación de los dominios que componen UPF1, resaltando el dominio helicasa de la proteína. (C) SDS-PAGE (8%) teñido con azul de Coomassie de la purificación de la proteína completa (UPF1 FL) y la forma truncada (UPF1 115-914).

UPF1 es una RBP de la que no se había descrito su asociación al elemento IRES. UPF1 está formada por 1118 aminoácidos, con varios motivos estructurales (Fig.35B). El motivo central contiene dos zonas con actividad helicasa, RecA1 y RecA2 y dos regiones reguladoras (1B y 1C). Los extremos C-terminal y N-terminal son zonas de baja complejidad, fosforiladas por SMG1 provocando la inhibición de la traducción al disociarse del ribosoma e inducir la degradación general del mRNA (Yamashita et al., 2001).

Para determinar la capacidad de unión de UPF1 al IRES obtuvimos la proteína purificada. Debido al pobre rendimiento obtenido en la purificación de la proteína completa (UPF1 FL) (Fig.35C) decidimos purificar una versión de la proteína en la que se ha deleciónado las regiones de baja complejidad N-terminal y C-terminal. Esta versión de la proteína, UPF1 115-914, facilita la purificación de la misma sin alterar su capacidad de unir al resto de componentes del complejo NMD o a mRNA (Melero et al., 2012).

Como el ensayo de SILAC se llevó a cabo usando el IRES completo, la sonda con la que se iniciaron los estudios de unión a UPF1 fue el IRES. Como se muestra en el ensayo de cross-link por luz UV, UPF1 115-914 reconoce la sonda de manera dependiente de dosis (Fig.36A, gel izquierdo). Debido a que el elemento IRES está compuesto por dominios con

RESULTADOS

diversos motivos conservados, comprobamos si UPF1 tenía diferente afinidad por unos u otros. El ensayo de interacción entre UPF1 y los dominios del IRES reveló que la afinidad por cada dominio por separado es menor que para el IRES completo, siendo mucho menor para el dominio 5 (Fig.36A, Gel central). Dado que se identificó UPF1 asociada al subdominio Bucle C y al D3, comprobamos si esa identificación correspondía a una asociación diferencial con alguno de los motivos estructurales que componen el dominio 3. UPF1 se asoció directamente a los subdominios D3, Bucle C y SL3abc, pero no al subdominio SL3a (Fig.36A). Estos ensayos ponen de manifiesto la interacción directa entre la helicasa UPF1 y el IRES de FMDV. El hecho de que no pueda detectarse la unión con el dominio 5 ni con el stem-loop 3a sugiere que no tiene afinidad por horquillas pequeñas.

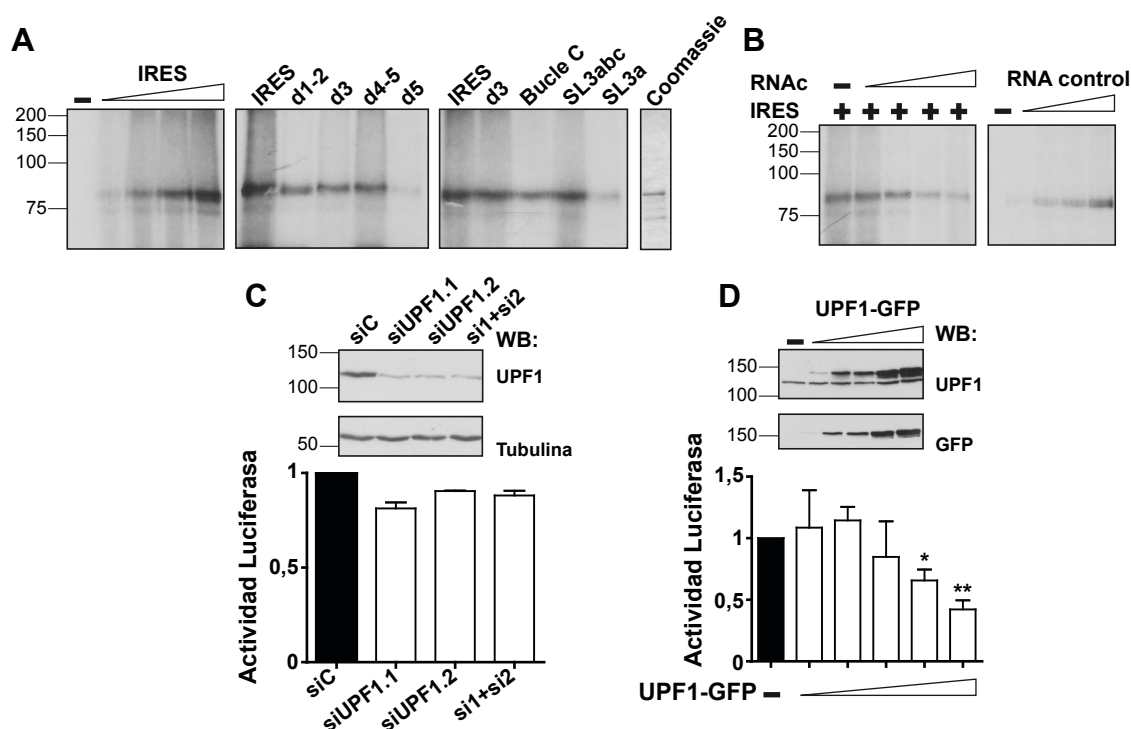


Figura 36. Asociación de UPF1 al IRES y efecto en su actividad. (A) Autorradiografía de los ensayos de crosslink por luz UV realizado con cantidades crecientes (25 a 200 ng) de la proteína UPF1 115-914 y las sondas indicadas en la parte superior de cada carril, resueltos en geles SDS-PAGE. La movilidad de la proteína se muestra a la derecha (azul de Coomassie). (B) Competición de la unión de UPF1 115-914 al IRES con RNA citosólico. Autorradiografía del ensayo de crosslink por luz UV del polipéptido UPF1 115-914 con un RNA control no relacionado con el IRES. (C) Depleción de UPF1 mediante 2 siRNAs y la combinación de ambos, en células HEK293. La tubulina se empleó como control de carga. El efecto de la depleción de la proteína sobre la actividad IRES se determinó respecto a la actividad luciferasa del plásmido bicistrónico. Se realizaron tres experimentos independientes y se calculó la actividad luciferasa respecto al siRNA control (siC). Las columnas representan la media \pm SD. (D) WB con anti-UPF1 y anti-GFP de la sobreexpresión de UPF1-GFP en células HEK293. Efecto sobre la traducción dependiente de IRES (media de tres ensayos \pm SD) (* $P < 0,01$, ** $P < 0,005$).

Para analizar la especificidad de la unión al IRES decidimos hacer un ensayo de competición usando RNA citosólico (Fig.36B, gel izquierdo). La unión a la sonda marcada fue competida en presencia de un exceso de RNA citosólico partir de la proporción 1:10, lo que sugiere que UPF1 puede reconocer múltiples dianas de RNA celulares.

Para verificar si la unión de la proteína al RNA era específica, realizamos un ensayo de crosslink por luz UV usando como sonda un RNA control no relacionado (Fig.36B, gel derecho). De nuevo, apareció una banda en el gel a la altura de la proteína purificada, pero a concentraciones mayores de proteína que con el IRES. Estos datos sugieren que UPF1 es una proteína de unión a RNA promiscua, probablemente a través de su dominio helicasa, capaz de unir al IRES de FMDV, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Para entender el posible papel que pueda jugar la unión de UPF1 al RNA, estudiamos el efecto que tiene la depleción de la proteína sobre la traducción IRES-dependiente. Los niveles celulares de la proteína disminuyeron en presencia de dos siRNAs, tanto separados como combinados (Fig.36C). Sin embargo, la actividad luciferasa no se alteró al transfectar el plásmido bicistrónico en las células deplecionadas para UPF1 (Fig.36C, gráfica inferior), sugiriendo que la proteína no está implicada en la traducción mediada por IRES. Para confirmar estos datos decidimos sobreexpresar la proteína fusionada a GFP (Fig.36D, WB superior). La expresión de UPF1-GFP provocó una disminución de la actividad luciferasa dependiente de dosis. Este dato, y la falta de efecto en el ensayo de depleción de la proteína, podrían sugerir que UPF1 está implicada en la estabilidad del RNA viral.

DISCUSIÓN



Las RBPs regulan todas las etapas de la vida del RNA, desde la transcripción, splicing, transporte, estabilidad, traducción hasta su degradación. La descripción y caracterización de RBPs se ha realizado, principalmente, a través de ensayos de purificación por afinidad en los que se emplea RNA unido a una matriz, para estudiar los factores que se purifican con el RNA. Por otro lado, se han desarrollado potentes metodologías para identificar las dianas RNA de proteínas específicas, en los que se lleva a cabo una inmunoprecipitación de la misma y se analizan por técnicas de secuenciación masiva los fragmentos de RNA asociados (PAR-CLIP etc.).

El interés de nuestro laboratorio se ha centrado en la regulación de la actividad de elementos IRES de picornavirus, en concreto FMDV. El IRES de FMDV es una región de RNA localizada en la región 5'-NTR de su genoma (Fig.3B). Está compuesto por 5 dominios estructurales distintos (1-2, 3, 4 y 5) y dirige la síntesis de la poliproteína viral a través de la interacción con factores de iniciación (como es el caso de eIF4G o eIF4B con el dominio 4), además de otras proteínas celulares (PTB en los dominios 1-2 y la región de cadena sencilla del dominio 5 o PCBP2 en el bucle rico en C del dominio 3). La presencia del IRES permite la síntesis de proteínas aún en condiciones de inhibición de la traducción dependiente de cap (por ejemplo, por la proteólisis de factores celulares como eIF4G, esencial para la formación del complejo 48S) (Walsh and Mohr, 2011). Sin embargo, numerosos trabajos han demostrado que el IRES se asocia a proteínas implicadas en distintas etapas del ciclo del RNA (Muller-McNicoll and Neugebauer, 2013), además de en procesos tan dispares como el metabolismo o la regulación del ciclo celular.

Mediante ensayos de purificación de proteínas por afinidad a RNA, se describió Gemin5 como un nuevo factor asociado al IRES (Pacheco et al., 2009). Gemin5 regula negativamente la actividad IRES, compitiendo con PTB por el sitio de unión en la región de cadena sencilla del dominio 5 (Pineiro et al., 2013). Gemin5 se proteoliza en células infectadas por FMDV por la proteasa L (Pineiro et al., 2012). Sin embargo, hasta ahora no se había determinado la región de la proteína responsable de su asociación al IRES y de la capacidad represora de la traducción IRES-dependiente. Además, ensayos de purificación por afinidad a RNA de proteínas asociadas tanto a los subdominios de dominio 3 *in vitro*, como a un RNA funcional que contiene el IRES *in vivo* han permitido identificar nuevas proteínas asociadas al IRES, algunas de las cuales reconocen regiones conservadas del mismo.

1. Gemin5: una proteína multifuncional implicada en la biogénesis de snRNPs y en el control de la traducción

El trabajo realizado en esta Tesis doctoral con la proteína Gemin5 ha identificado las regiones de la proteína responsables de la interacción con el elemento IRES y de regular la traducción dependiente del mismo (Fernandez-Chamorro et al., 2014). Gemin5 es una proteína de 170 kDa (1508 aminoácidos) que posee 14 repeticiones del motivo WD en su extremo N-terminal y dos dominios con capacidad de unión a RNA, RBS1 (1297-1412) y RBS2 (1383-1508), en su extremo C-terminal, responsables de la interacción con el IRES (Fig.9). La sobreexpresión de distintos fragmentos de la proteína en células silenciadas para Gemin5, demostró que el polipéptido 1383-1508 disminuye la traducción dependiente de

IRES en células humanas en cultivo (Fig.14). Además, este péptido mantiene la capacidad de unir el IRES en ensayos *in vitro*. Sin embargo, aunque los polipéptidos que contienen RBS1 y RBS2 individualmente son suficientes para unir directamente el dominio 5 del IRES, RBS1 muestra mayor afinidad por RNA que RBS2. Polipéptidos mayores que incluyen estos sitios de unión a RNA también interaccionan con el IRES, a diferencia del fragmento N-terminal de Gemin5, que incluyen los dominios WD.

Los dominios de unión a RNA localizados en la región C-terminal de Gemin5 no contienen motivos canónicos identificables en bases de datos de RBPs. Con objeto de obtener información estructural sobre esta región de la proteína, analizamos mediante NMR la región RBS1, que es la que muestra mayor capacidad de unir RNA. Sin embargo, en el espectro solo se pudieron definir el 80% de las señales (Fig.10C), impidiendo asignar todas las resonancias, sugiriendo que esta región de la proteína corresponde a un dominio intrínsecamente desestructurado. Las asignaciones de algunos fragmentos usando esqueletos estándar de experimentos de resonancia triple y la dispersión de las señales de NMR que aparecen en el espectro sugieren que la región RBS1 adquiere una conformación helicoidal corta, rodeado de zonas desestructuradas, coincidente con la predicción de estructura secundaria (Fig.10B).

Algunas IUPs contienen regiones flexibles que desempeñan varias funciones, mientras que otras adoptan una conformación tridimensional única al formar complejos con sus ligandos (Dyson and Wright, 2005). Se han descrito IUPs implicadas en señalización celular, regulación del ciclo celular, reconocimiento de DNA, e interacción RNA-proteína, entre otras funciones (Markus et al., 1997; Romero et al., 2001; Weiss et al., 1990). Las regiones desordenadas de las proteínas suelen estar enriquecidas en aminoácidos Glu, Lys, Arg, Gly, Gln, Ser, Pro y Ala, mientras que son deficientes en aminoácidos Ile, Leu, Val, Trp, Phe, Tyr y Cys. La baja cantidad de aminoácidos hidrofóbicos, que son muy abundantes en las proteínas con estructuras tridimensionales únicas, es una característica físico-química de los plegamientos en coiled-coil (Parry, 1982). En el espectro NMR, las proteínas desordenadas, o de baja complejidad, ofrecen una dispersión de señal pobre, como la observada en el dominio RBS1 de Gemin5. Esta flexibilidad representa una ventaja en las proteínas que reconocen múltiples ligandos, debido a su capacidad de adoptar la conformación adecuada al reconocer cada uno de ellos. Sin embargo, esta característica dificulta la identificación de los residuos implicados en el reconocimiento del RNA, debido a que los cambios físico-químicos observado entre la proteína libre y la unida al RNA implican múltiples conformaciones. En nuestro caso fue imposible determinar los residuos de Gemin5 implicados en reconocer el dominio 5, ya que el espectro NMR del péptido RBS1 no se alteraba al añadir un RNA con la secuencia de la horquilla del dominio 5 (dato no mostrado). Por otra parte, este resultado es coherente con el hecho de que la región del dominio 5 reconocida por la proteína, que reside en la región de cadena sencilla y no en la horquilla (Pineiro et al., 2013).

De acuerdo a los modelos de predicción de estructura secundaria de la región C-terminal de Gemin5, RBS2 está formado por cuatro hélices (Fig.10B). La secuencia de la segunda hélice (H2) está enriquecida en Leu (LECCLVLLLI), mientras que la tercera hélice (H3) es rica en Glu (QEMQQQAQELLQ). A pesar de que ninguna de estas hélices constituyen

un dominio de unión a RNA canónico, se ha descrito que motivos ricos en leucina y, sobretudo, los ricos en glutamina median la interacción de algunas proteínas con RNA, como LRPRPC (Mili and Pinol-Roma, 2003) o Tia1 (Dember et al., 1996). Estos datos apoyan la capacidad de unión a RNA de G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈ (Fig.9).

El análisis funcional de Gemin5 mediante la expresión de distintos polipéptidos en células humanas, en las que se redujo la cantidad de la proteína endógena, aportó nuevos datos sobre su mecanismo de regulación de la traducción. El efecto negativo de Gemin5 en la traducción dependiente de IRES se localizó en RBS2. Por otro lado, la sobreexpresión de los fragmentos G5₁₂₉₇₋₁₄₁₂ o G5₈₄₅₋₁₄₃₆, que contienen RBS1, pero no RBS2, no tuvo un efecto apreciable en la eficiencia de traducción, mientras que la expresión de G5₁₂₈₇₋₁₅₀₈ o G5₈₄₅₋₁₅₀₈ estimularon la traducción. El efecto diferencial de los polipéptidos de la proteína Gemin5 sobre la traducción nos llevaron a proponer una hipótesis para explicar su actividad (Fig.17B). En esta hipótesis proponemos diferencias en la capacidad de los fragmentos de Gemin5 de adoptar distintas conformaciones que impliquen una mayor o menor exposición de RBS2. La proteína completa interaccionaría con el IRES a través del sitio bipartito de unión a RNA (RBS1 y RBS2), reprimiendo la traducción. Los polipéptidos G5₈₄₅₋₁₅₀₈ y G5₁₂₈₇₋₁₅₀₈, que no poseen la región N-terminal, podrían sufrir un cambio conformacional en la región flexible RBS1 que lleva a una menor exposición de RBS2 y, con ello, no solo perderían la capacidad de inhibir la traducción, sino que la estimularían. La región RBS1 sola es capaz de unir el IRES, pero no de regular su traducción, mientras que RBS2 une el dominio5 y además, reprime la traducción.

En consonancia con esta hipótesis, datos anteriores demostraron que Gemin5 es proteolizada durante la infección de FMDV generando, al menos, dos fragmentos: p85 y p57 (Pineiro et al., 2012), correspondientes a G5₈₄₅₋₁₅₀₈ y G5₈₄₅₋₁₄₃₆, respectivamente. La proteólisis de Gemin5 tiene lugar a tiempos de infección similares a otras proteínas como PABP o PTB, pero significativamente más tarde que la de eIF4G. Por ello, sugerimos que probablemente contribuye a la inhibición de la expresión de RNAs celulares mediante mecanismos independientes de eIF4G. La proteólisis de Gemin5 también puede afectar al ensamblaje de los snRNPs y con ello a los procesos de splicing, afectando la viabilidad de la célula.

Debido a que p85 y p57 presentan una acumulación diferencial en células infectadas (Pineiro et al., 2012), decidimos investigar el papel de estos productos en la regulación de la traducción. Sorprendentemente, mientras que la proteína completa reprime la traducción, G5₈₄₅₋₁₄₃₆, que es el producto que se acumula en las células infectadas, no altera la eficiencia de traducción IRES-dependiente. Por otro lado, el péptido más pequeño, G5₁₃₈₃₋₁₅₀₈, no se detecta en células infectadas, lo que sugiere que es inestable (Pineiro et al., 2012). Sin embargo, la expresión de este péptido mediante transfección en células reprime la traducción.

Estos datos nos permiten sugerir un modelo para explicar el papel de Gemin5 durante la infección por FMDV (Fig.17C). Al inicio de la infección, eIF4G es proteolizada por la proteasa L de FMDV, provocando la disminución de la traducción cap-dependiente. En esta etapa, Gemin5 se comportaría como un inhibidor general de la traducción. Posteriormente, la proteólisis de Gemin5 genera el péptido p85, similar al polipéptido G5₈₄₅₋₁₅₀₈, que estimula la traducción dependiente de IRES. En etapas tardías de la infección, p85 es proteolizada

generando un producto detectable, p57, y un producto no detectable, p21. p57 corresponde al polipéptido G5₈₄₅₋₁₄₃₆ que no tiene efecto sobre la traducción, mientras que p21 contiene RBS2. Dado que p21 es inestable, no ejerce efecto represor sobre la traducción del RNA viral. En resumen, Gemin5 es una proteína capaz de unir el dominio 5 del IRES de FMDV a través de los dominios RBS1 y RBS2 presentes en su extremo C-terminal. El dominio RBS1 adquiere una conformación intrínsecamente desestructurada. Además, la capacidad de reprimir la actividad IRES reside en el dominio RBS2.

Gemin5 se une directamente al IRES a través de un dominio que contiene una horquilla y una región de cadena sencilla, sin embargo un análisis mutacional demostró que permite un alto grado de flexibilidad de secuencia (Pineiro et al., 2012). La capacidad de unir este dominio del IRES reside en una región de Gemin5 distinta a la descrita anteriormente como responsable de unir al sitio sm de los snRNAs o a la estructura cap (Battle et al., 2006; Jin et al., 2016; Xu et al., 2016). Estudios posteriores han demostrado la presencia de Gemin5 en el interactoma del mRNA eucariota (Castello et al., 2012). Otros autores han determinado la capacidad de Gemin5 de unirse a la región 3'-NTR del mRNA de la proteína SMN, estimulando su traducción cuando disminuye la cantidad de proteína SMN (Workman et al., 2015). Estos datos resaltan la importancia de Gemin5 en la regulación de la traducción de la célula en respuesta a distintos estímulos, y además, demuestra la existencia de distintas dianas de RNA reconocidas por dominios específicos de la proteína Gemin5 que se ensamblan en distintos complejos ribonucleoproteicos (RNPs).

Trabajos recientes de nuestro laboratorio han demostrado la interacción de Gemin5 con el ribosoma, así como con las proteínas ribosomales L3 y L4 a través de su región N-terminal, siendo claves los residuos F381 y Y474 (Francisco-Velilla et al., 2016). En esta región de la proteína se localizan las repeticiones WD, que son dominios típicos de interacción proteína-proteína. Los datos obtenidos sugieren que la proteína se comporta como una plataforma con capacidad de reconocer múltiples ligandos, tanto proteínas como RNA, pertenecientes a complejos RNPs implicados en distintos eventos celulares, como el ensamblaje de los snRNPs, la traducción global o la traducción de mRNAs específicos.

Trabajos futuros sobre los RNAs reconocidos por Gemin5 y el efecto que pueda tener sobre su regulación aportarán información que permita entender el papel de esta RBP multifuncional en el control de la expresión génica.

2. Los dominios estructurales del IRES son reconocidos diferencialmente por factores celulares implicados en diversas funciones

Numerosos autores han combinado distintas técnicas de purificación de proteínas asociadas a RNA con análisis proteómicos para identificar RBPs que reconocen motivos específicos de secuencia (Castello et al., 2012; Gerstberger et al., 2014). Nuestro trabajo ha tratado de identificar proteínas que reconozcan diferencialmente dominios de RNA cuya estructura tridimensional es esencial para su función. Para ello, hemos empleado subdominios del dominio 3 del IRES, que contiene una región apical con estructura cruciforme soportada por cruce de cuatro caminos (Fernandez et al., 2011). Esta región está implicada en interac-

ciones a larga distancia entre el subdominio SL3abc y el bucle rico en C (Fernandez-Miragall et al., 2006). Las proteínas asociadas diferencialmente a cada uno de los subdominios del dominio 3 se purificaron mediante afinidad utilizando bolas magnéticas recubiertas de estreptavidina (Fig.19), gracias a la presencia de un aptámero de estreptavidina en el RNA quimera. La estructura de los subdominios estudiados se intentó mantener expresándolos en un esqueleto de tRNA, reemplazando la región del anticodón (Ponchon et al., 2009).

La clasificación de los factores asociados con cada subdominio de acuerdo al proceso biológico que está sobrerrepresentado (Fig.22) mostró que los distintos subdominios son reconocidos por varias redes de proteínas. Algunas redes son comunes a todos los subdominios, aunque con distinto grado de significatividad estadística, desde 10^{-5} hasta 10^{-30} . De entre las redes comunes, resultaron novedosas e inesperadas las redes de proteínas asociadas al transporte ER-Golgi y proteínas implicadas en el transporte y localización de proteínas. Además de estas dos redes, también aparecieron en los cuatro subdominios las redes de factores de traducción, síntesis de aminoácidos y nucleótidos, splicing, procesamiento y estabilidad del RNA, acorde con el tipo de abordaje y RNA empleado en la purificación.

En general, se observa un aumento del número de redes a la vez que aumenta el tamaño del RNA con el que se realizó la purificación de proteínas. Por ejemplo, las redes de regulación del ciclo celular y proteólisis sólo son significativas con los subdominios Bucle-C y D3. El transcrito D3 presenta, además, una red de proteínas ribosomales, sugiriendo que la conformación adoptada por el RNA D3 tiene mayor afinidad por el ribosoma que cada uno de los subdominios por separado. Estos datos son concordantes con los trabajos que sugieren que el D3 podría adoptar un plegamiento similar al de un tRNA (Serrano et al., 2007).

El número de proteínas identificadas con el subdominio SL3abc es algo menor que el de los subdominios SL3a y D3 (Fig.20D), y además, las proteínas se distribuyen en un menor número de redes y nudos funcionales (Fig.22B). Este dato sugiere que el subdominio SL3abc adopta una conformación más cerrada que impide que proteínas que reconocen el brazo 3a cuando se encuentra solo, sean capaces de reconocerlo en la estructura tridimensional que adopta la región apical del dominio 3 (Fernandez et al., 2011).

Las proteínas identificadas incluyen mayoritariamente RBPs (Fig.23A). Entre ellas, aparecen factores implicados en splicing (SF3B1-2, hnRNPs como hnRNPUL1 o SFPQ), proteínas implicadas en la formación de SGs como ATXN2L (Kaehler et al., 2012), y otras que reconocen metilaciones en el RNA para promover su traducción como YTDHF1 (Wang et al., 2015). Además, el análisis GO señaló redes estadísticamente significativas las proteínas que participan en el transporte a través de orgánulos intracelulares, así como redes de señalización que pudieran regular procesos como el ciclo celular. Entre las proteínas de transporte aparecieron actores principales de las dos rutas de transporte entre orgánulos: el anterógrado, o COPII, (Sec24, Sec31 o Sar1a) y el retrógrado, o COPI (COPA), junto con proteínas asociadas a orgánulos, como ARF5. Entre las proteínas de señalización se identificaron numerosos miembros de la familia Rab (Rab1b, Rab1a, Rab2a, Rab11b o Rab10).

La aparición de distintos factores asociados a los subdominios del dominio 3 sugiere que la secuencia, y el plegamiento, influye en la interacción RNA-proteínas. Para verificar esta posibilidad decidimos seleccionar algunas de las proteínas más novedosas para verificar si

DISCUSIÓN

su identificación se debía una interacción directa con el RNA o estaba mediada por otras proteínas adaptadoras. Las proteínas seleccionadas fueron Rab1b y ARF5 (asociadas al transporte entre orgánulos), SYNCRIP y NONO (implicadas en splicing), Celf1 (implicada en la edición del RNA, además del splicing alternativo), Caprin (implicada en la formación de SGs) y las proteínas de la subunidad menor del ribosoma RPS25 y Rack1 (implicadas en la actividad IRES) (Fig.37).

		Rab1b	ARF5	RPS25	Rack1	SYNCRIP	Celf1	NONO	Caprin	UPF1
MS/MS	D3	No	No	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí
	Bucle C	No	Sí	Sí	Sí	No	No	No	Sí	Sí
	SL3abc	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí	No
	SL3a	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	No	No
Unión a RNA	UV - XL	D3	Sí	x	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
		Bucle C	Sí	x	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
		SL3abc	Sí	x	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
		SL3a	No	x	No	Sí	Sí	Sí	Sí	No
		IRES	x	x	x	x	x	x	x	Sí
	Retardo RNA	D3	Sí	Sí	x	x	No	x	x	x
		Bucle C	Sí	Sí	x	x	Sí	x	x	x
		SL3abc	Sí	Sí	x	x	Sí	x	x	x
		SL3a	No	Sí	x	x	Sí	x	x	x
		IRES	x	x	x	x	x	x	x	x
	Actividad IRES		—	↓	—	↓	↑	—	x	x

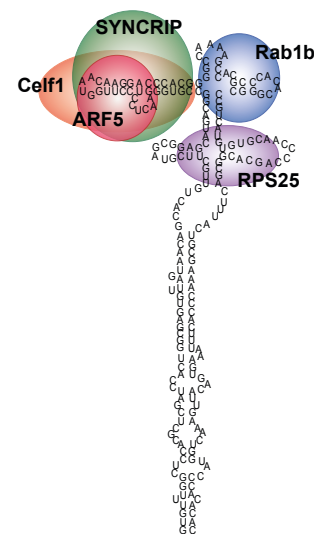


Figura 37. Resumen del estudio de las proteínas identificadas con los subdominios del dominio 3. Se representan las proteínas analizadas respecto a su capacidad de asociarse a los subdominios del dominio 3 analizado por crosslink de luz UV o retardo en geles nativos y su efecto sobre la actividad IRES. Sí, indica interacción directa; No, indica falta de interacción. (X), indica experimentos no realizados o de los que no se ha podido obtener información, los guiones indican ausencia de efecto. Las flechas rojas indican inhibición y la verde, estimulación de la traducción. A la derecha se muestra un esquema de la interacción entre el dominio 3 y algunas proteínas estudiadas.

Los ensayos de interacción RNA-proteína demostraron que todas las proteínas seleccionadas reconocían directamente alguno de los subdominios del dominio 3, por lo tanto son RBPs.

a) Proteínas asociadas al transporte de proteínas: La interacción directa entre ARF5 y Rab1b con los distintos subdominios es muy novedosa, dado que su capacidad de unir RNA no está descrita. Además, su asociación con el dominio 3 permite sugerir nuevas funciones para el IRES, debido a que son proteínas implicadas en la regulación de las rutas de trans-

porte COPI y COPII. Por lo tanto su interacción con esta región del RNA viral sugiere que el IRES está implicado en la localización del RNA viral a los compartimentos celulares en los que tiene lugar el transporte y maduración de proteínas. Tanto Rab1b como ARF5 se localizan en el entorno ER-Golgi. Por un lado, Rab1b es una proteína con localización citosólica que se asocia a membrana cuando está unida a GTP (Fig.7). Esta proteína es la efectora de GBF1 para la activación del transporte COPI (Monetta et al., 2007), aunque también interacciona con proteínas implicadas en la formación de vesículas a través de la ruta de transporte COPII (Slavin et al., 2011). Por otro lado, ARF5 es una proteína que permanece unida al Golgi independientemente de su estado de activación y se asocia con las vesículas implicadas en el transporte COPI.

A pesar de no haber podido determinar la capacidad de interaccionar con el RNA de ARF5 y Rab1b mediante los dos abordajes experimentales empleados (retardo en gel y crosslink con luz UV), estas proteínas no muestran la misma afinidad por todos los subdominios, indicando que pueden reconocer distintas secuencias o plegamientos para interaccionar con los RNAs (Fig.37). Rab1b reconoce los RNAs D3, Bucle-C y SL3abc, pero no se detectó su interacción con SL3a. Por tanto, el brazo 3a individualmente no permite la interacción directa entre Rab1b y el dominio 3. Estos datos difieren de los obtenidos mediante espectrometría de masas, en los que se identificó Rab1b asociada a SL3a, sugiriendo que su unión a este subdominio podría ser indirecta (Fig.37). Rab1b mostró afinidad mayor por el RNA Bucle-C en todos los ensayos analizados (Fig.26B). Los resultados obtenidos sugieren que la zona de interacción directa entre Rab1b y el D3 es la región apical (SL3abc).

La afinidad de ARF5 a todos los subdominios fue similar, observándose la formación de un complejo retardado con concentraciones de proteína mayores (500 nM) que las empleadas con Rab1b (25 nM). La identificación de ARF5 mediante espectrometría de masas fue positiva para todos los subdominios (Fig.37). Cabe destacar que ARF5 se identificó solo en uno de los dos ensayos independientes con el subdominio SL3a, por lo que su ausencia puede deberse a variación experimental. Sin embargo, los experimentos de interacción RNA-proteína sugieren que la región reconocida por la proteína es el brazo 3a, pues es la región común a todos los subdominios estudiados (Fig.37).

La depleción de Rab1b no tiene efecto en la actividad IRES (Fig.26E), mientras que la ausencia de ARF5 aumenta la traducción dirigida por IRES (Fig.27D). Este dato sugiere que ARF5 es un débil regulador negativo de la traducción mediada por IRES. Se ha descrito que ARF5, junto con ARF4, son esenciales para la replicación de otros virus con genoma RNA de polaridad positiva, como es HCV (Farhat et al., 2016), lo que sugiere que en el ciclo de FMDV, ARF5 podría estar implicada en distintas etapas, además de reprimir su traducción.

Las infecciones por virus con genoma RNA de orientación positiva (Picornavirus o Flavivirus, entre otros) provocan una reorganización de las membranas celulares que llevan a la formación de los RO, unas estructuras dinámicas donde tiene lugar la replicación viral (Miller and Krijnse-Locker, 2008). La replicación en estos orgánulos presenta ventajas para el curso de la infección, como puede ser la concentración de las proteínas virales necesarias para la síntesis del RNA viral o la protección frente a los sensores celulares que desencadenarían la respuesta antiviral (den Boon et al., 2010). El estudio de la formación de los RO,

llevado a cabo mediante técnicas de microscopía electrónica, ha determinado que implica precursores (2BC) y proteínas virales maduras (2B, 2C y 3A) (Barco and Carrasco, 1995; Belov et al., 2012). La formación de estos RO durante la infección se produce a la vez que se desestabiliza el Golgi (Limpens et al., 2011), sugiriendo que los componentes de la membrana del Golgi son importantes para la organización de los RO. Este dato se ve reforzado por la inhibición de la replicación de algunos picornavirus en presencia de la droga Brefeldina-A (BFA), que desorganiza el Golgi de modo dependiente de GBF1 y ARF1 (Gazina et al., 2002; Martin-Acebes et al., 2008).

En resumen, la formación de los RO y la replicación viral tiene lugar alrededor del ER y el Golgi. Sin embargo, hay pocos datos sobre donde tiene lugar la traducción del RNA viral (Desmet et al., 2014; Panyasrivani et al., 2009). En el RE se localizan numerosos ribosomas, tanto monosomas como polisomas, que traducen RNAs que codifican proteínas solubles cuya localización es el propio RE o el Golgi, pero también los de proteínas cuyo destino es el citoplasma (Diehn et al., 2006; Lerner et al., 2003). Estos ribosomas son menos sensibles a la inhibición de la traducción debida a la fosforilación de eIF2 α , probablemente por la presencia de un reservorio propio de eIF2 α menos accesible a las quinasas (Jagannathan et al., 2014). Uno de los estímulos que desencadena la fosforilación de eIF2 α es la presencia del RNA viral en el citoplasma. Durante la inhibición de la traducción en células por infección por el enterovirus Coxsackie B3 (CBV3) o estrés de retículo con DTT tiene lugar un desplazamiento de mRNAs que contienen IRES (celular o viral) o señales para la síntesis de proteínas de membrana al RE (Gaddam et al., 2013; Lerner and Nicchitta, 2006). Sin embargo, hay pocos datos que expliquen si este proceso es debido a regiones concretas del mRNA o a la interacción con determinadas proteínas que dirigen los mRNAs al RE.

Esta información, junto con la interacción que hemos demostrado entre el IRES y las proteínas ARF5 y Rab1b, nos permite sugerir un modelo en el cual el IRES podría estar implicado en la localización del genoma viral en el entorno del RE-Golgi a través de la interacción con las proteínas presentes en estos orgánulos (Fig.38). Tras la entrada del virus en la célula y la liberación de su genoma al citoplasma, éste se encuentra en desventaja numérica respecto a los mRNAs celulares. La interacción del RNA viral a través del IRES con proteínas como Rab1b, que tiene una localización citoplasma-RE, puede favorecer su desplazamiento al retículo. La alta concentración de ribosomas en el RE, junto con la afinidad del dominio 3 por los mismos, permitiría la primera ronda de traducción del RNA viral. La síntesis de las proteasas virales L y 3C que proteolizan eIF4G entre otras proteínas, inhiben la traducción dependiente de cap, disminuyendo la presencia de mRNAs competidores del RNA viral por ribosomas y eIFs, mientras que la síntesis de proteínas no estructurales (2BC, 2B, 2C y 3A) favorecería la formación de ROs, donde tiene lugar tanto la replicación del RNA viral como las nuevas rondas de traducción. A través de la asociación del IRES con las proteínas del transporte COPII (Sec24 o Sec31) se desplazarían tanto proteínas de la cápsida viral como el genoma hacia el Golgi para su encapsidación y posterior liberación tras la lisis celular.

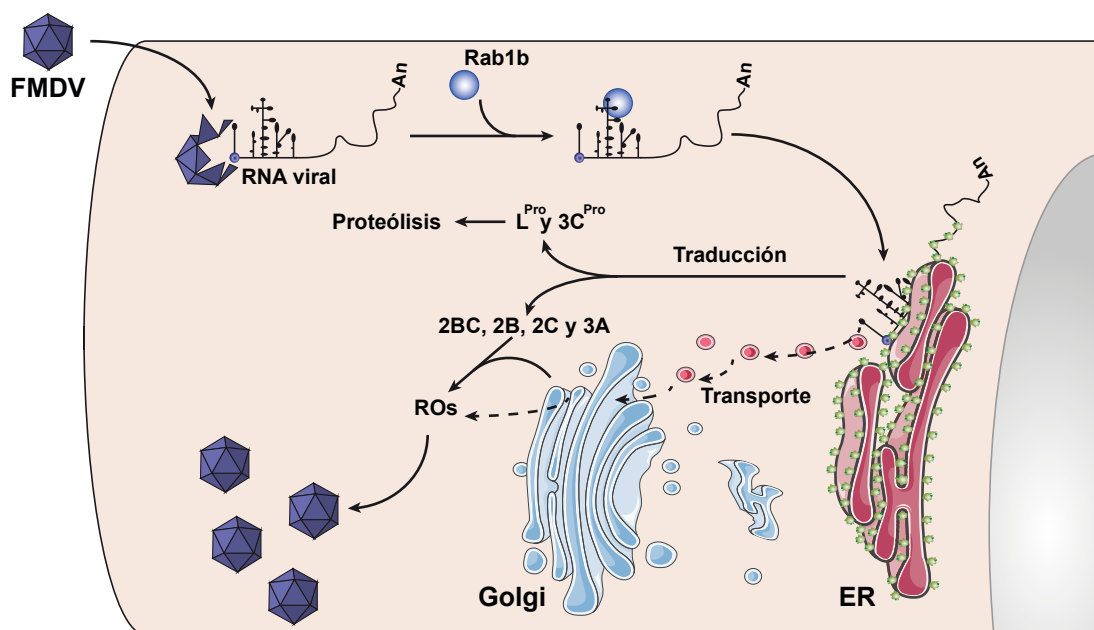


Figura 38. Modelo hipotético del desplazamiento del RNA viral a través de la interacción entre el IRES y Rab1b.

Aunque la depleción de Rab1b no tiene efecto sobre la traducción mediada por el IRES de FMDV, esto puede deberse a la redundancia funcional entre Rab1a y Rab1b (Tisdale et al., 1992). La sobreexpresión de un dominante negativo de Rab1b (no intercambia GDP por GTP, (Alvarez et al., 2003), provoca la desorganización del Golgi, de modo similar a lo que ocurre durante la infección por FMDV, pero además, la infección está favorecida en presencia de este mutante (Midgley et al., 2013). Esto indica que cuando las rutas de transporte están inactivadas la infección está favorecida, ya que se impide el reciclaje de membranas. Este dato sugiere que la interacción con el IRES, además de localizar el RNA viral en la región ER-Golgi, pueda impedir el intercambio GDP-GTP de Rab1b, favoreciendo la infección viral.

b) Proteínas ribosomales: El mayor número de proteínas ribosomales identificadas con el dominio 3 sugiere una interacción entre el mismo y el ribosoma. Los datos obtenidos para dos proteínas ribosomales, RPS25 y Rack1, confirman la interacción entre proteínas de la subunidad menor del ribosoma y el IRES (Fig.25). RPS25 interacciona con los subdominios D3 y Bucle C, mientras que Rack1 reconoce todos los subdominios del dominio 3 (Fig.37). Rack1 desempeña funciones en el citoplasma, sin estar asociado al ribosoma (Adams et al., 2011). Esta capacidad de actuar al margen del ribosoma puede tener distintas interpretaciones. Una es que Rack1 pueda estar siendo secuestrado en el ribosoma y solo se libere en respuesta a determinados estímulos. Otra es que la unión de Rack1 al ribosoma puede provocar un arresto de la traducción de mRNAs específicos. Finalmente, Rack1 puede llevar a cabo sus funciones de señalización asociado al ribosoma, permitiendo a la maquinaria de señalización regular también al ribosoma para la traducción de proteínas (Coyle et al., 2009). La interacción entre Rack1 y el IRES puede implicar la formación de un puente funcional que acerque el RNA viral al ribosoma, y una vez asociado, puede favorecer

el secuestro de Rack1 en el ribosoma, impidiendo además la interacción de Rack1 con sus ligandos, que podrían inhibir la traducción dependiente de IRES.

Los datos obtenidos con RPS25 demuestran que no afecta a la actividad del IRES de FMDV. Trabajos anteriores demostraron que RPS25 es esencial para la traducción dirigida por los IRES de los dicistrovirus o flavivirus, mientras que la actividad de los IRES de picornavirus como PV (IRES tipo I) o EMCV (IRES tipo II) son menos sensibles a la depleción de RPS25 (Hertz et al., 2013).

c) RBP que reconocen el dominio 3: Nuestros datos demuestran que el dominio 3 es reconocido por distintas RBPs, como SYNCRIP, Celf1, NONO o Caprin (Fig.37). SYNCRIP es una proteína implicada en splicing, que muestra una afinidad mayor para los subdominios de la región apical (SL3a y SL3abc y el Bucle-C) que para el D3. La interacción entre SYNCRIP y los subdominios es competida por RNA citoplásmico, especialmente la de los subdominios SL3a y SL3abc, sugiriendo que tiene diversas dianas celulares (Fig.28B-C). SYNCRIP es un estimulador de la actividad IRES, puesto que la traducción dependiente de IRES se inhibe en células donde SYNCRIP está silenciada (Fig.28D). Este resultado también ocurre con el IRES de HCV, pero no con los IRES de PV o EMCV (Kim et al., 2004). En el caso de la traducción mediada por el IRES de HCV, su efecto se basa en facilitar el posicionamiento de la subunidad 40S sobre el IRES (Park et al., 2011). Un modelo semejante explicaría que la interacción entre el IRES de FMDV con el ribosoma podría estar dirigida por SYNCRIP.

Nuestros resultados han demostrado la interacción de los subdominios estructurales del dominio 3 con proteínas implicadas en diversos procesos celulares, como el transporte entre orgánulos o el splicing, con distinto efecto sobre la traducción IRES-dependiente. Estos datos sugieren que el dominio 3 no sólo es esencial para el plegamiento del IRES y la traducción viral, sino que a través de la interacción con proteínas celulares está implicado en otras etapas del ciclo viral. La replicación de los virus RNA con orientación positiva tiene lugar en el entorno RE-Golgi, a través de la remodelación de las membranas celulares para la generación de los RO. Sin embargo, no se ha podido determinar un mecanismo común a todos ellos. Trabajos posteriores podrán confirmar si la presencia del IRES en el RNA viral implica un mecanismo común basado en la interacción de la región 5'-NTR del genoma viral con proteínas del ER o el Golgi y si la falta de conservación de secuencia y estructura existente los IRES de distintos virus, puede explicar la diversidad de factores y mecanismos observados durante la infección.

3. Factores específicamente asociados a RNAs portadores del elemento IRES funcional en células en cultivo

Mediante SILAC hemos identificado nuevas proteínas que están específicamente asociadas a un RNA funcional que contiene el IRES de FMDV en células HEK293-MS2-HB. Para ello, hemos purificado proteínas por afinidad a un RNA que contiene seis repeticiones de la horquilla reconocida por la proteína MS2.

La señal de biotinización *in vivo* permite la purificación de la proteína MS2 de manera eficiente y específica (Guerrero et al., 2006; Tagwerker et al., 2006) (Fig.32C). Además, la expresión constitutiva de la proteína MS2-HB en las células asegura niveles estables de la proteína y facilita la normalización de los datos de espectrometría de masas. Aunque tanto las purificaciones como las identificaciones de proteínas unidas al RNA que contiene el IRES y al RNA control se llevan a cabo en paralelo, el error experimental desplaza ligeramente los picos de los datos espectrometría de masas. Este desplazamiento se corrige con la proteína MS2-HB, dado que su presencia es uniforme en todas las condiciones experimentales.

El número de proteínas purificadas con el RNA que contiene el IRES fue mayor que para el RNA en el que estaba ausente, como se observa en la representación de la distribución de las proteínas en función del $\text{Log}_2(\text{Cap/IRES})$, donde aparece un desplazamiento hacia la izquierda en la gráfica de la Fig.33B. Este resultado determinó que aplicáramos un criterio único para establecer el límite en el valor de la proporción Cap/IRES a partir del cual podíamos considerar una proteína como específicamente asociada al RNA que contiene IRES. Ese valor límite fue el de la proteína PTB, un ITAF que estimula la actividad IRES (Pestova et al., 1996) (Fig.33B-C).

El análisis computacional de las proteínas asociadas específicamente al IRES reveló cuatro redes principales: síntesis de aminoácidos y nucleótidos, proteínas ribosomales, splicing, procesamiento y estabilidad del RNA y factores de traducción. La red de proteínas ribosomales sugiere mayor afinidad del ribosoma por el RNA que contiene el IRES. Esta mayor afinidad representa una ventaja para el RNA viral en las etapas tempranas de la infección, en las que compite con los mRNAs celulares por los ribosomas para sintetizar la poliproteína viral.

Entre las proteínas asociadas diferencialmente al RNA que contiene el IRES se identificaron proteínas cuya capacidad de reconocer el IRES ya se había descrito, como Ebp1, la helicasa DHX29, PCBP1-2 o G3BP, lo que aportaba solidez los resultados obtenidos.

Durante esta Tesis doctoral se han identificado nuevas proteínas de unión al IRES mediante dos abordajes distintos. La comparación de las proteínas identificadas a través del SILAC y en la purificación de proteínas asociadas a los subdominios del dominio 3 muestra que el 30% de las proteínas identificadas unidas al IRES completo se identificaron asociadas a los subdominios D3 y Bucle C (22+8 y 22+7, respectivamente), y el 10% de las mismas se identificaron con SL3ab y SL3a (7+5 y 7+9, respectivamente) (Fig.39). Entre estas proteínas aparecen, además de proteínas ribosomales, RBPs como Caprin, UPF1 o hnRNPA1, proteínas de metabolismo de lípidos como FAS, y proteínas de señalización como ILF-3.

Estos datos sugieren que existe un paralelismo entre las proteínas identificadas usando un RNA transcrito *in vitro* y el IRES expresado *in vivo* en el contexto de un RNA funcionalmente activo; esta correspondencia es mayor en el dominio 3 completo. Además, se identificaron otras proteínas, la mayoría RBPs, cuya interacción con el IRES era desconocida, como UPF1, eIF4A3, relacionadas con la degradación de mRNAs; o PABP y STAU, que son ligandos de UPF1 (Ivanov et al., 2008; Kim et al., 2005). Estos datos nos llevaron a estudiar más en detalle la capacidad de UPF1 de unir el IRES y regular su traducción.

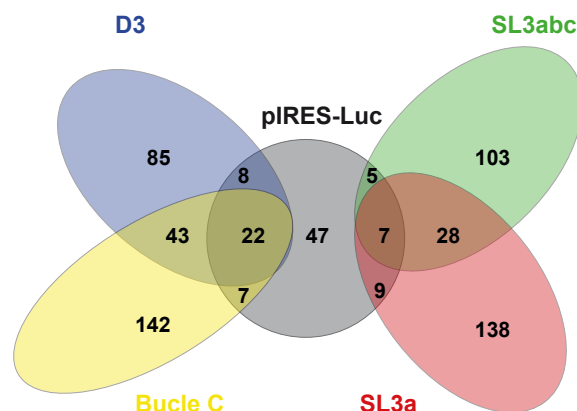


Figura 39. Proteínas identificadas en las purificaciones por afinidad. Diagrama de la coincidencia de proteínas identificadas asociadas a los subdominios del dominio 3 respecto a las identificadas diferencialmente unidas al RNA pIRES-Luc.

a) UPF1, una RBP promiscua que se asocia al IRES: La síntesis de proteínas incompletas o con mutaciones desencadena la agregación o acumulación de las mismas, afectando la viabilidad de las células y por ello, provocando diversas enfermedades, como las ataxias. Las células eucariotas han desarrollado mecanismos que controlan la traducción de los mRNAs, una de estas rutas es la degradación de mRNAs mediado por la presencia de codones de terminación prematuros (NMD). Esta ruta no solo sirve para eliminar aquellos mRNAs que presenten mutaciones o defectos de splicing, sino que también permite regular rápidamente los mRNAs que se traducen en respuesta a estímulos externos. La proteína UPF1 es esencial para la ruta NMD, pues es la responsable de enviar los mRNAs a degradación (Kurosaki and Maquat, 2016) (Fig.40).

Durante el splicing, que tiene lugar en el núcleo, el mRNA es reconocido por el complejo de reconocimiento de la unión de exones (EJC) (Moore, 2005). Este complejo incluye la proteína de unión a cap 80 (CBP80), que se intercambia por eIF4E tras la primera ronda de traducción en el citoplasma, y se sitúa unos 20-24 nucleótidos por delante de las uniones exón-exón del mRNA. Si no se han producido mutaciones durante la transcripción o fallos en el splicing que generen codones de parada prematuros (PTCs), el ribosoma disocia estos complejos del mRNA durante la primera ronda de traducción (Fig.40). Sin embargo, si se han producido mutaciones que generen PTCs, el EJC permanece unido al mRNA en una o más uniones de exones tras el codón de parada y no es eliminado durante el escaneo del ribosoma. El EJC es reconocido por las proteínas UPF2-UPF3 que reclutan a UPF1, que se encuentra asociada a las proteínas SMG1, 8 y 9 (Yamashita et al., 2009). SMG1 fosforila a UPF1 en su región C-terminal, siendo reconocido por SMG6, una endonucleasa que se asocia transitoriamente para degradar el mRNA (Huntzinger et al., 2008).

Nuestros resultados demuestran que una versión truncada de UPF1, a la que le falta la zona de fosforilación por SMG1, es capaz de interactuar con todos los dominios del IRES (Fig.36A). Esta unión es inespecífica, ya que es competida por RNA celular. Además, un RNA no relacionado con el IRES produce una banda de interacción RNA-proteína en ensayos de crosslink por luz UV (Fig.36B). Estos datos sugieren que UPF1 es una RBP pro-

miscua, de acuerdo con trabajos que muestran la capacidad de UPF1 de unir RNAs, aunque no sean dianas del NMD (Kurosaki and Maquat, 2013; Lee et al., 2015). En la unión con estos RNAs se mantiene su actividad helicasa, pero no se desencadena la degradación del RNA, ya que UPF1 es desplazada por el ribosoma durante la traducción. Sin embargo, a pesar de no tener una secuencia de reconocimiento definida, los datos aportados por nuestros experimentos sugieren que existe una limitación de estructura del RNA o de longitud del mismo, ya que con las sondas correspondientes al dominio 5 o al brazo 3a se detectaron intensidades menores que con dominios de mayor longitud o con conformaciones distintas (Fig.36A).

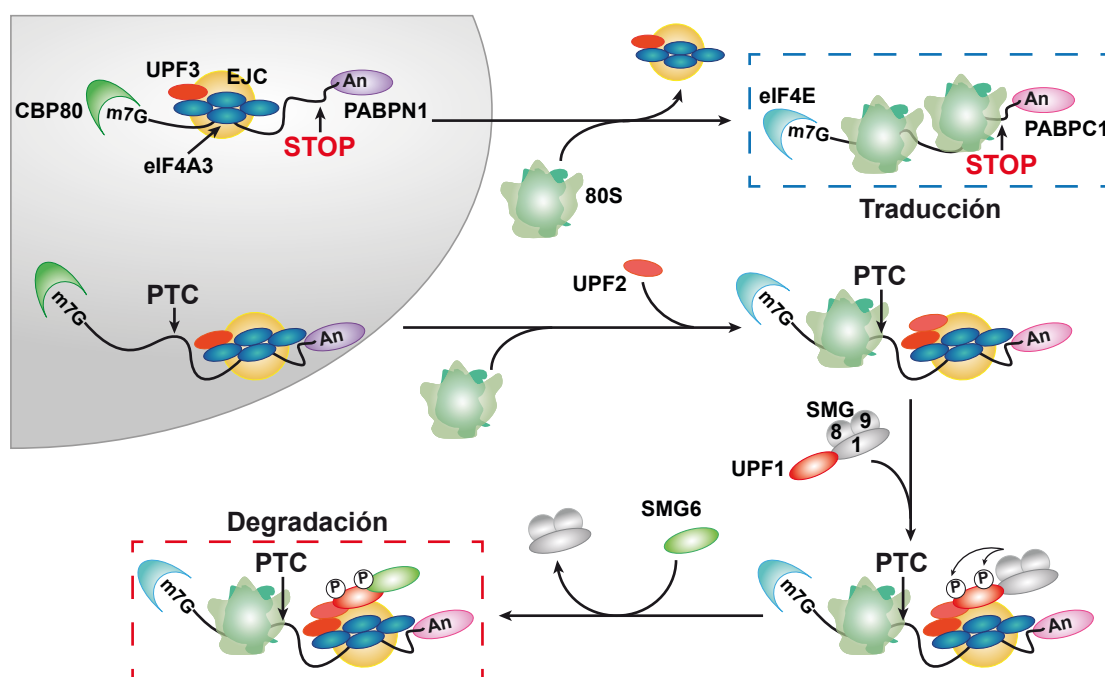


Figura 40. Representación esquemática del mecanismo de control de calidad del mRNA (NMD). Los mRNAs que contienen un codón de parada en el sitio adecuado (STOP, en rojo), se traducen por el debido al desplazamiento de todos su EJC por los ribosomas 80S durante la fase de elongación. Los mRNAs que poseen codones de parada prematuros (PTC), mantienen el EJC, que recluta a UPF1. La fosforilación de UPF1 recluta, entre otras proteínas SMG6, que degrada el mRNA.

La sobreexpresión de la proteína UPF1 provocó una caída significativa de la señal luciferasa del plásmido bicistronicovv. Este resultado muestra que la presencia de altas cantidades de UPF1 en el citoplasma inhiben la traducción IRES-dependiente. Sin embargo, la depleción de UPF1 no tuvo ningún efecto sobre la traducción dirigida por IRES (Fig.36C). Trabajos anteriores demostraron que un RNA transcrito en el núcleo, que contiene el IRES de EMCV es reconocido y degradado por la ruta NMD en un mecanismo dependiente de la presencia de CBP80/20 (Woeller et al., 2008). Ensayos posteriores que determinen la integridad del RNA podrían indicar si la disminución de la actividad IRES es un efecto debido al reconocimiento por UPF1. La asociación del factor CBP80/20 a un RNA tiene lugar en el núcleo y solo permanece durante la primera ronda de traducción.

Por ello, para determinar si el RNA viral, que tiene una localización citoplásmica, es reconocido y degradado a través del reconocimiento del IRES por UPF1, sería necesario analizar su comportamiento durante la infección.

En resumen, en este trabajo hemos tratado de integrar técnicas de purificación de proteínas por afinidad al RNA en células con un análisis cuantitativo. Hemos determinado que un RNA que contiene el IRES de FMDV interacciona con un mayor número de proteínas ribosomales que un RNA que no lo contiene. Se han identificado nuevas RBPs, entre las que hemos validado UPF1. UPF1 es una RBP promiscua, que reconoce de manera directa el IRES y muestra una menor afinidad por regiones de RNA cortas o que se pliegan formando una horquilla. Hemos comprobado que la sobreexpresión de UPF1 tiene un efecto represor de la actividad IRES, aunque no hemos podido establecer una relación directa entre la ruta NMD y la traducción dirigida por IRES.

4. Importancia del IRES en la multiplicación viral

Aunque la presencia del IRES en el genoma de los virus RNA permite su traducción durante la infección, nuestros resultados sugieren que podría tener nuevas funciones en el ciclo de multiplicación viral. La capacidad del IRES de interactuar con proteínas implicadas en distintos procesos celulares, como la traducción, el splicing, la formación de SGs, el transporte a través de orgánulos o la degradación de mRNAs indican que su importancia va más allá de dirigir la síntesis de la poliproteína viral. Por ejemplo, podría tener implicaciones en la localización del genoma viral para la formación de los RO o facilitar la encapsidación. Trabajos posteriores dirigidos a determinar el papel del IRES en la localización de un RNA pueden arrojar luz sobre la importancia de la interacción entre regiones conservadas del dominio 3 y proteínas como Rab1b o ARF5.

Además de los resultados presentados en esta Tesis doctoral, se ha llevado a cabo un estudio en paralelo sobre la relevancia funcional del tramo conservado de pirimidinas del dominio 5 del IRES utilizando un abordaje de diseño de RNAs sintéticos (Fernandez-Chamorro et al., 2016). Mediante el diseño computacional de RNAs sintéticos capaces de adoptar una estructura que secuestra el tramo de pirimidinas en una horquilla establecimos una correlación entre la accesibilidad del tramo de pirimidinas y la actividad IRES, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los datos obtenidos apoyan la hipótesis de que el secuestro del tramo de pirimidinas en una horquilla inhibe la traducción dependiente de IRES. Además, cuanto más estable es la horquilla, más fuerte fue la inhibición de la síntesis de proteínas. Este trabajo se realizó combinando abordajes *in silico* con análisis estructurales vía SHAPE para determinar la implicación de motivos estructurales en la función del IRES. En particular, demostramos la utilidad del software RNAiFold (Garcia-Martin et al., 2016) para el diseño de RNA sintéticos con una secuencia y plegamiento específicos.

CONCLUSIONES



1. La interacción entre polipéptidos de Gemin5 y el dominio 5 del IRES de FMDV demostró que la proteína contiene dos dominios de unión a RNA no canónicos en su extremo C-terminal (RBS1 y RBS2). El dominio RBS1 adopta una conformación intrínsecamente desestructurada, mientras que el dominio RBS2 contiene una hélice rica en Leu y otra rica en Gln.

2. La capacidad represora de la actividad IRES de Gemin5 reside en el dominio RBS2. Sin embargo, polipéptidos más grandes que contienen el dominio RBS2 estimulan la traducción mediada por el IRES, sugiriendo que la exposición de RBS2 es esencial para la regulación de la actividad IRES

3. RNAs quimeras basados en un esqueleto de tRNA con aptámeros de estreptavidina permitieron purificar las proteínas asociadas a los subdominios estructurales del IRES. El análisis de las proteínas purificadas mediante espectrometría de masas reveló que el dominio 3 es reconocido por proteínas implicadas en varios procesos celulares (traducción, splicing, transporte entre orgánulos, estabilidad de RNA...)

4. Hemos identificado dos nuevas proteínas de unión a RNA, ARF5 y Rab1b. Además, ARF5 es un represor débil de la actividad IRES. La asociación directa entre estas proteínas implicadas en el transporte entre orgánulos y los subdominios del dominio 3 sugieren que el IRES pueda estar implicado en la localización del RNA viral durante la infección.

5. Hemos caracterizado las RBPs SYNCRIP, Celf1, NONO y Caprin como nuevos factores asociados a los motivos estructurales del dominio 3. Además, hemos descrito la interacción de dos proteínas ribosomales, RPS25 y Rack1, con el dominio 3 del IRES. De entre ellos, SYNCRIP estimula la actividad IRES, mientras que Rack1 la reprime.

6. La purificación de proteínas celulares asociadas a un RNA funcional que contiene el IRES frente a uno que no lo contiene mediante SILAC sugiere que la presencia del IRES es importante para la asociación de la maquinaria traduccional.

7. UPF1, una proteína de unión a RNA implicada en el control de calidad de los RNAs que se traducen, se asocia directamente a los dominios del IRES. Aunque la depleción de UPF1 no tiene efecto en la actividad IRES, su sobreexpresión la disminuye, probablemente al degradar el RNA que contiene el IRES.

8. Los datos recogidos en esta Tesis doctoral sugieren que el IRES es importante para la multiplicación viral no solo para dirigir la traducción de la poliproteína viral, sino en la localización del RNA en los ribosomas del retículo endoplásmico y en el transporte del genoma viral hacia los orgánulos de replicación para su encapsidación.

BIBLIOGRAFÍA

- Acker, M. G., Shin, B. S., Dever, T. E., and Lorsch, J. R. (2006). Interaction between eukaryotic initiation factors 1A and 5B is required for efficient ribosomal subunit joining. *J Biol Chem* 281, 8469-8475.
- Adams, D. R., Ron, D., and Kiely, P. A. (2011). RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Commun Signal* 9, 22.
- Ainaoui, N., Hantelys, F., Renaud-Gabardos, E., Bunel, M., Lopez, F., Pujol, F., Planes, R., Bahraoui, E., Pichereaux, C., Burlet-Schiltz, O., et al. (2015). Promoter-Dependent Translation Controlled by p54nrb and hnRNPM during Myoblast Differentiation. *PLoS One* 10, e0136466.
- Alvarez, C., Garcia-Mata, R., Brandon, E., and Sztul, E. (2003). COPI recruitment is modulated by a Rab1b-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 14, 2116-2127.
- Andreev, D. E., Fernandez-Miragall, O., Ramajo, J., Dmitriev, S. E., Terenin, I. M., Martinez-Salas, E., and Shatsky, I. N. (2007). Differential factor requirement to assemble translation initiation complexes at the alternative start codons of foot-and-mouth disease virus RNA. *RNA* 13, 1366-1374.
- Anger, A. M., Armache, J. P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D. N., and Beckmann, R. (2013). Structures of the human and *Drosophila* 80S ribosome. *Nature* 497, 80-85.
- Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L., and Schekman, R. (2001). Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol* 3, 531-537.
- Asano, K., Clayton, J., Shaley, A., and Hinnebusch, A. G. (2000). A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes Dev* 14, 2534-2546.
- Barco, A., and Carrasco, L. (1995). A human virus protein, poliovirus protein 2BC, induces membrane proliferation and blocks the exocytic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14, 3349-3364.
- Barlowe, C., d'Enfert, C., and Schekman, R. (1993). Purification and characterization of SAR1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 268, 873-879.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M., and Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77, 895-907.
- Barlowe, C., and Schekman, R. (1993). SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* 365, 347-349.
- Basu, A., Dong, B., Krainer, A. R., and Howe, C. C. (1997). The intracisternal A-particle proximal enhancer-binding protein activates transcription and is identical to the RNA- and DNA-binding protein p54nrb/NonO. *Mol Cell Biol* 17, 677-686.
- Battle, D. J., Lau, C. K., Wan, L., Deng, H., Lotti, F., and Dreyfuss, G. (2006). The Gemin5 protein of the SMN complex identifies snRNAs. *Mol Cell* 23, 273-279.
- Belov, G. A., Feng, Q., Nikovics, K., Jackson, C. L., and Ehrenfeld, E. (2008). A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication. *PLoS Pathog* 4, e1000216.
- Belov, G. A., Nair, V., Hansen, B. T., Hoyt, F. H., Fischer, E. R., and Ehrenfeld, E. (2012). Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes. *J Virol* 86, 302-312.
- Belov, G. A., and van Kuppeveld, F. J. (2012). (+)RNA viruses rewire cellular pathways to build replication organelles. *Curr Opin Virol* 2, 740-747.
- Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S. M., Singer, R. H., and Long, R. M. (1998). Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol Cell* 2, 437-445.
- Bird, S. W., Maynard, N. D., Covert, M. W., and Kirkegaard, K. (2014). Nonlytic viral spread enhanced by autophagy components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 13081-13086.

BIBLIOGRAFÍA

- Boussadia, O., Niepmann, M., Creancier, L., Prats, A. C., Dautry, F., and Jacquemin-Sablon, H. (2003). Unr is required in vivo for efficient initiation of translation from the internal ribosome entry sites of both rhinovirus and poliovirus. *J Virol* 77, 3353-3359.
- Bradrick, S. S., and Gromeier, M. (2009). Identification of gemin5 as a novel 7-methylguanosine cap-binding protein. *PLoS One* 4, e7030.
- Carey, J., Cameron, V., de Haseth, P. L., and Uhlenbeck, O. C. (1983). Sequence-specific interaction of R17 coat protein with its ribonucleic acid binding site. *Biochemistry* 22, 2601-2610.
- Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B. M., Strein, C., Davey, N. E., Humphreys, D. T., Preiss, T., Steinmetz, L. M., et al. (2012). Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* 149, 1393-1406.
- Cate, J. H. (2017). Human eIF3: from 'blobology' to biological insight. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372.
- Clarke, B. E., Brown, A. L., Currey, K. M., Newton, S. E., Rowlands, D. J., and Carroll, A. R. (1987). Potential secondary and tertiary structure in the genomic RNA of foot and mouth disease virus. *Nucleic Acids Res* 15, 7067-7079.
- Clarke, B. E., Sangar, D. V., Burroughs, J. N., Newton, S. E., Carroll, A. R., and Rowlands, D. J. (1985). Two initiation sites for foot-and-mouth disease virus polyprotein in vivo. *J Gen Virol* 66 (Pt 12), 2615-2626.
- Consortium, T. G. O. (2017). Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. *Nucleic Acids Res* 45, D331-D338.
- Conte, M. R., Grune, T., Ghuman, J., Kelly, G., Ladas, A., Matthews, S., and Curry, S. (2000). Structure of tandem RNA recognition motifs from polypyrimidine tract binding protein reveals novel features of the RRM fold. *EMBO J* 19, 3132-3141.
- Coyle, S. M., Gilbert, W. V., and Doudna, J. A. (2009). Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome in vivo. *Mol Cell Biol* 29, 1626-1634.
- Chang, T. C., Yamashita, A., Chen, C. Y., Yamashita, Y., Zhu, W., Durdan, S., Kahvejian, A., Sonenberg, N., and Shyu, A. B. (2004). UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translationally coupled mRNA turnover mediated by the c-fos major coding-region determinant. *Genes Dev* 18, 2010-2023.
- Chung, H. J., Liu, J., Dundr, M., Nie, Z., Sanford, S., and Levens, D. (2006). FBP's are calibrated molecular tools to adjust gene expression. *Mol Cell Biol* 26, 6584-6597.
- Dasgupta, T., and Ladd, A. N. (2012). The importance of CELF control: molecular and biological roles of the CUG-BP, Elav-like family of RNA-binding proteins. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 104-121.
- Dember, L. M., Kim, N. D., Liu, K. Q., and Anderson, P. (1996). Individual RNA recognition motifs of TIA-1 and TIAR have different RNA binding specificities. *J Biol Chem* 271, 2783-2788.
- den Boon, J. A., Diaz, A., and Ahlquist, P. (2010). Cytoplasmic viral replication complexes. *Cell Host Microbe* 8, 77-85.
- Desmet, E. A., Anguish, L. J., and Parker, J. S. (2014). Virus-mediated compartmentalization of the host translational machinery. *MBio* 5, e01463-01414.
- Diehn, M., Bhattacharya, R., Botstein, D., and Brown, P. O. (2006). Genome-scale identification of membrane-associated human mRNAs. *PLoS Genet* 2, e11.
- Dodd, D. A., Giddings, T. H., Jr., and Kirkegaard, K. (2001). Poliovirus 3A protein limits interleukin-6 (IL-6), IL-8, and beta interferon secretion during viral infection. *J Virol* 75, 8158-8165.
- Donaldson, J. G., and Jackson, C. L. (2011). ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 362-375.

- Donnelly, M. L., Hughes, L. E., Luke, G., Mendoza, H., ten Dam, E., Gani, D., and Ryan, M. D. (2001). The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J Gen Virol* 82, 1027-1041.
- Duden, R. (2003). ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review). *Mol Membr Biol* 20, 197-207.
- Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 197-208.
- Edwards, J., Malaurie, E., Kondrashov, A., Long, J., de Moor, C. H., Searle, M. S., and Emsley, J. (2011). Sequence determinants for the tandem recognition of UGU and CUG rich RNA elements by the two N-terminal RRM of CELF1. *Nucleic Acids Res* 39, 8638-8650.
- Farhat, R., Seron, K., Ferlin, J., Feneant, L., Belouzard, S., Goueslain, L., Jackson, C. L., Dubuisson, J., and Rouille, Y. (2016). Identification of class II ADP-ribosylation factors as cellular factors required for hepatitis C virus replication. *Cell Microbiol* 18, 1121-1133.
- Fernandez-Chamorro, J., Lozano, G., Garcia-Martin, J. A., Ramajo, J., Dotu, I., Clote, P., and Martinez-Salas, E. (2016). Designing synthetic RNAs to determine the relevance of structural motifs in picornavirus IRES elements. *Sci Rep* 6, 24243.
- Fernandez-Chamorro, J., Pineiro, D., Gordon, J. M., Ramajo, J., Francisco-Velilla, R., Macias, M. J., and Martinez-Salas, E. (2014). Identification of novel non-canonical RNA-binding sites in Gemin5 involved in internal initiation of translation. *Nucleic Acids Res* 42, 5742-5754.
- Fernandez-Miragall, O., and Martinez-Salas, E. (2003). Structural organization of a viral IRES depends on the integrity of the GNRA motif. *RNA* 9, 1333-1344.
- Fernandez-Miragall, O., Ramos, R., Ramajo, J., and Martinez-Salas, E. (2006). Evidence of reciprocal tertiary interactions between conserved motifs involved in organizing RNA structure essential for internal initiation of translation. *RNA* 12, 223-234.
- Fernandez, N., Garcia-Sacristan, A., Ramajo, J., Briones, C., and Martinez-Salas, E. (2011). Structural analysis provides insights into the modular organization of picornavirus IRES. *Virology* 409, 251-261.
- Fierro-Monti, I., Mohammed, S., Matthiesen, R., Santoro, R., Burns, J. S., Williams, D. J., Proud, C. G., Kassem, M., Jensen, O. N., and Roepstorff, P. (2006). Quantitative proteomics identifies Gemin5, a scaffolding protein involved in ribonucleoprotein assembly, as a novel partner for eukaryotic initiation factor 4E. *J Proteome Res* 5, 1367-1378.
- Fitzgerald, K. D., and Semler, B. L. (2009). Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim Biophys Acta* 1789, 518-528.
- Flather, D., Cathcart, A. L., Cruz, C., Baggs, E., Ngo, T., Gershon, P. D., and Semler, B. L. (2016). Generation of Recombinant Polioviruses Harboring RNA Affinity Tags in the 5' and 3' Noncoding Regions of Genomic RNAs. *Viruses* 8.
- Fox, J. T., and Stover, P. J. (2009). Mechanism of the internal ribosome entry site-mediated translation of serine hydroxymethyltransferase 1. *J Biol Chem* 284, 31085-31096.
- Francisco-Velilla, R., Fernandez-Chamorro, J., Ramajo, J., and Martinez-Salas, E. (2016). The RNA-binding protein Gemin5 binds directly to the ribosome and regulates global translation. *Nucleic Acids Res* 44, 8335-8351.
- Fringer, J. M., Acker, M. G., Fekete, C. A., Lorsch, J. R., and Dever, T. E. (2007). Coupled release of eukaryotic translation initiation factors 5B and 1A from 80S ribosomes following subunit joining. *Mol Cell Biol* 27, 2384-2397.
- Gaddam, D., Stevens, N., and Hollien, J. (2013). Comparison of mRNA localization and regulation during endoplasmic reticulum stress in *Drosophila* cells. *Mol Biol Cell* 24, 14-20.
- Gamarnik, A. V., and Andino, R. (2000). Interactions of viral protein 3CD and poly(rC) binding protein with the 5' untranslated region of the poliovirus genome. *J Virol* 74, 2219-2226.

BIBLIOGRAFÍA

- Garcia-Blanco, M. A., Jamison, S. F., and Sharp, P. A. (1989). Identification and purification of a 62,000-dalton protein that binds specifically to the polypyrimidine tract of introns. *Genes Dev* 3, 1874-1886.
- Garcia-Martin, J. A., Dotu, I., Fernandez-Chamorro, J., Lozano, G., Ramajo, J., Martinez-Salas, E., and Clote, P. (2016). RNAiFold2T: Constraint Programming design of thermo-IRES switches. *Bioinformatics* 32, i360-i368.
- Gaynor, E. C., Graham, T. R., and Emr, S. D. (1998). COPI in ER/Golgi and intra-Golgi transport: do yeast COPI mutants point the way? *Biochim Biophys Acta* 1404, 33-51.
- Gazina, E. V., Mackenzie, J. M., Gorrell, R. J., and Anderson, D. A. (2002). Differential requirements for COPI coats in formation of replication complexes among three genera of Picornaviridae. *J Virol* 76, 11113-11122.
- Gerstberger, S., Hafner, M., and Tuschl, T. (2014). A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet* 15, 829-845.
- Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J., and Dreyfuss, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett* 582, 1977-1986.
- Goenka, S., and Kaplan, M. H. (2011). Transcriptional regulation by STAT6. *Immunol Res* 50, 87-96.
- Grimm, C., Chari, A., Pelz, J. P., Kuper, J., Kisker, C., Diederichs, K., Stark, H., Schindelin, H., and Fischer, U. (2013). Structural basis of assembly chaperone-mediated snRNP formation. *Mol Cell* 49, 692-703.
- Gubitz, A. K., Mourelatos, Z., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J Biol Chem* 277, 5631-5636.
- Guerrero, C., Tagwerker, C., Kaiser, P., and Huang, L. (2006). An integrated mass spectrometry-based proteomic approach: quantitative analysis of tandem affinity-purified in vivo cross-linked protein complexes (QTAX) to decipher the 26 S proteasome-interacting network. *Mol Cell Proteomics* 5, 366-378.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hao le, T., Fuller, H. R., Lam le, T., Le, T. T., Burghes, A. H., and Morris, G. E. (2007). Absence of gemin5 from SMN complexes in nuclear Cajal bodies. *BMC Cell Biol* 8, 28.
- Hartman, T. R., Qian, S., Bolinger, C., Fernandez, S., Schoenberg, D. R., and Boris-Lawrie, K. (2006). RNA helicase A is necessary for translation of selected messenger RNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13, 509-516.
- Hellen, C. U., Krausslich, H. G., and Wimmer, E. (1989). Proteolytic processing of polyproteins in the replication of RNA viruses. *Biochemistry* 28, 9881-9890.
- Hertz, M. I., Landry, D. M., Willis, A. E., Luo, G., and Thompson, S. R. (2013). Ribosomal protein S25 dependency reveals a common mechanism for diverse internal ribosome entry sites and ribosome shunting. *Mol Cell Biol* 33, 1016-1026.
- Hinnebusch, A. G. (2014). The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu Rev Biochem* 83, 779-812.
- Hong, M., Yoon, S. I., and Wilson, I. A. (2012). Structure and functional characterization of the RNA-binding element of the NLRX1 innate immune modulator. *Immunity* 36, 337-347.
- Huang, M., Weissman, J. T., Beraud-Dufour, S., Luan, P., Wang, C., Chen, W., Aridor, M., Wilson, I. A., and Balch, W. E. (2001). Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH2 terminus in ER export. *J Cell Biol* 155, 937-948.
- Huntzinger, E., Kashima, I., Fauser, M., Sauliere, J., and Izaurralde, E. (2008). SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan. *RNA* 14, 2609-2617.

- Ivanov, P. V., Gehring, N. H., Kunz, J. B., Hentze, M. W., and Kulozik, A. E. (2008). Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J* 27, 736-747.
- Jackson, C. L., and Bouvet, S. (2014). Arfs at a glance. *J Cell Sci* 127, 4103-4109.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 113-127.
- Jagannathan, S., Reid, D. W., Cox, A. H., and Nicchitta, C. V. (2014). De novo translation initiation on membrane-bound ribosomes as a mechanism for localization of cytosolic protein mRNAs to the endoplasmic reticulum. *RNA* 20, 1489-1498.
- Jang, S. K., Krausslich, H. G., Nicklin, M. J., Duke, G. M., Palmenberg, A. C., and Wimmer, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol* 62, 2636-2643.
- Jarvelin, A. I., Noerenberg, M., Davis, I., and Castello, A. (2016). The new (dis)order in RNA regulation. *Cell Commun Signal* 14, 9.
- Jimenez, J., Jang, G. M., Semler, B. L., and Waterman, M. L. (2005). An internal ribosome entry site mediates translation of lymphoid enhancer factor-1. *RNA* 11, 1385-1399.
- Jin, W., Wang, Y., Liu, C. P., Yang, N., Jin, M., Cong, Y., Wang, M., and Xu, R. M. (2016). Structural basis for snRNA recognition by the double-WD40 repeat domain of Gemin5. *Genes Dev* 30, 2391-2403.
- Jonas, S., and Izaurralde, E. (2013). The role of disordered protein regions in the assembly of decapping complexes and RNP granules. *Genes Dev* 27, 2628-2641.
- Kaehler, C., Isensee, J., Nonhoff, U., Terrey, M., Hucho, T., Lehrach, H., and Krobitsch, S. (2012). Ataxin-2-like is a regulator of stress granules and processing bodies. *PLoS One* 7, e50134.
- Kafasla, P., Morgner, N., Poyry, T. A., Curry, S., Robinson, C. V., and Jackson, R. J. (2009). Polypyrimidine tract binding protein stabilizes the encephalomyocarditis virus IRES structure via binding multiple sites in a unique orientation. *Mol Cell* 34, 556-568.
- Katoh, H., Okamoto, T., Fukuhara, T., Kambara, H., Morita, E., Mori, Y., Kamitani, W., and Matsuura, Y. (2013). Japanese encephalitis virus core protein inhibits stress granule formation through an interaction with Caprin-1 and facilitates viral propagation. *J Virol* 87, 489-502.
- Kawamoto, K., Yoshida, Y., Tamaki, H., Torii, S., Shinotsuka, C., Yamashina, S., and Nakayama, K. (2002). GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors, is localized to the cis-Golgi and involved in membrane association of the COPI coat. *Traffic* 3, 483-495.
- Ke, P. Y., and Chen, S. S. (2011). Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J Clin Invest* 121, 37-56.
- Kedersha, N., and Anderson, P. (2002). Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 30, 963-969.
- Kennedy, D., French, J., Guitard, E., Ru, K., Tocque, B., and Mattick, J. (2001). Characterization of G3BPs: tissue specific expression, chromosomal localisation and rasGAP(120) binding studies. *J Cell Biochem* 84, 173-187.
- Keryer-Bibens, C., Barreau, C., and Osborne, H. B. (2008). Tethering of proteins to RNAs by bacteriophage proteins. *Biol Cell* 100, 125-138.
- Kim, J. H., Paek, K. Y., Ha, S. H., Cho, S., Choi, K., Kim, C. S., Ryu, S. H., and Jang, S. K. (2004). A cellular RNA-binding protein enhances internal ribosomal entry site-dependent translation through an interaction downstream of the hepatitis C virus polyprotein initiation codon. *Mol Cell Biol* 24, 7878-7890.
- Kim, Y. K., Furic, L., Desgroseillers, L., and Maquat, L. E. (2005). Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120, 195-208.

BIBLIOGRAFÍA

- Knott, G. J., Bond, C. S., and Fox, A. H. (2016). The DBHS proteins SFPQ, NONO and PSPC1: a multipurpose molecular scaffold. *Nucleic Acids Res* 44, 3989-4004.
- Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V., Hellen, C. U., and Shatsky, I. N. (1998). Translation eukaryotic initiation factor 4G recognizes a specific structural element within the internal ribosome entry site of encephalomyocarditis virus RNA. *J Biol Chem* 273, 18599-18604.
- Kolupaeva, V. G., Unbehaun, A., Lomakin, I. B., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2005). Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40S subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association. *RNA* 11, 470-486.
- Kowalska, E., Ripperger, J. A., Muheim, C., Maier, B., Kurihara, Y., Fox, A. H., Kramer, A., and Brown, S. A. (2012). Distinct roles of DBHS family members in the circadian transcriptional feedback loop. *Mol Cell Biol* 32, 4585-4594.
- Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* 108, 229-241.
- Kroiss, M., Schultz, J., Wiesner, J., Chari, A., Sickmann, A., and Fischer, U. (2008). Evolution of an RNP assembly system: a minimal SMN complex facilitates formation of UsnRNPs in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10045-10050.
- Kudelko, M., Brault, J. B., Kwok, K., Li, M. Y., Pardigon, N., Peiris, J. S., Bruzzone, R., Despres, P., Nal, B., and Wang, P. G. (2012). Class II ADP-ribosylation factors are required for efficient secretion of dengue viruses. *J Biol Chem* 287, 767-777.
- Kurosaki, T., and Maquat, L. E. (2013). Rules that govern UPF1 binding to mRNA 3' UTRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 3357-3362.
- Kurosaki, T., and Maquat, L. E. (2016). Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *J Cell Sci* 129, 461-467.
- Lau, C. K., Bachorik, J. L., and Dreyfuss, G. (2009). Gemin5-snRNA interaction reveals an RNA binding function for WD repeat domains. *Nat Struct Mol Biol* 16, 486-491.
- Lawrence, P., and Rieder, E. (2017). Foot-and-mouth Disease Virus Receptors: Multiple Gateways to Initiate Infection. In *Foot-and-mouth Disease Virus*, F. Sobrino, and Domingo, E., ed. (Madrid: Caister Academic Press), pp. 107-137.
- Lawrence, P., and Rieder, E. (2009). Identification of RNA helicase A as a new host factor in the replication cycle of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 83, 11356-11366.
- Lee, S. R., Pratt, G. A., Martinez, F. J., Yeo, G. W., and Lykke-Andersen, J. (2015). Target Discrimination in Nonsense-Mediated mRNA Decay Requires Upf1 ATPase Activity. *Mol Cell* 59, 413-425.
- Lee, Y. F., Nomoto, A., Detjen, B. M., and Wimmer, E. (1977). A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 59-63.
- Lerner, R. S., and Nicchitta, C. V. (2006). mRNA translation is compartmentalized to the endoplasmic reticulum following physiological inhibition of cap-dependent translation. *RNA* 12, 775-789.
- Lerner, R. S., Seiser, R. M., Zheng, T., Lager, P. J., Reedy, M. C., Keene, J. D., and Nicchitta, C. V. (2003). Partitioning and translation of mRNAs encoding soluble proteins on membrane-bound ribosomes. *RNA* 9, 1123-1137.
- Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S. D., Riezman, H., and Cosson, P. (1994). Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* 79, 1199-1207.
- Limpens, R. W., van der Schaar, H. M., Kumar, D., Koster, A. J., Snijder, E. J., van Kuppeveld, F. J., and Barcena, M. (2011). The transformation of enterovirus replication structures: a three-dimensional study of single- and double-membrane compartments. *MBio* 2.
- Liu, H. M., Aizaki, H., Choi, K. S., Machida, K., Ou, J. J., and Lai, M. M. (2009). SYNCRIP (synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein) is a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication. *Virology* 386, 249-256.

- Liu, L., Ouyang, M., Rao, J. N., Zou, T., Xiao, L., Chung, H. K., Wu, J., Donahue, J. M., Gorospe, M., and Wang, J. Y. (2015). Competition between RNA-binding proteins CELF1 and HuR modulates MYC translation and intestinal epithelium renewal. *Mol Biol Cell* 26, 1797-1810.
- Lopez-Serra, P., Marcilla, M., Villanueva, A., Ramos-Fernandez, A., Palau, A., Leal, L., Wahi, J. E., Setien-Baranda, F., Szczesna, K., Moutinho, C., et al. (2014). A DERL3-associated defect in the degradation of SLC2A1 mediates the Warburg effect. *Nat Commun* 5, 3608.
- Lopez de Quinto, S., Lafuente, E., and Martinez-Salas, E. (2001). IRES interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. *RNA* 7, 1213-1226.
- Lopez de Quinto, S., and Martinez-Salas, E. (1997). Conserved structural motifs located in distal loops of aphthovirus internal ribosome entry site domain 3 are required for internal initiation of translation. *J Virol* 71, 4171-4175.
- Lopez de Quinto, S., and Martinez-Salas, E. (1999). Involvement of the aphthovirus RNA region located between the two functional AUGs in start codon selection. *Virology* 255, 324-336.
- Lopez de Quinto, S., and Martinez-Salas, E. (2000). Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. *RNA* 6, 1380-1392.
- Lopez de Quinto, S., Saiz, M., de la Morena, D., Sobrino, F., and Martinez-Salas, E. (2002). IRES-driven translation is stimulated separately by the FMDV 3'-NCR and poly(A) sequences. *Nucleic Acids Res* 30, 4398-4405.
- Lorsch, J. R., and Dever, T. E. (2010). Molecular view of 43 S complex formation and start site selection in eukaryotic translation initiation. *J Biol Chem* 285, 21203-21207.
- Lozano, G., Fernandez, N., and Martinez-Salas, E. (2016). Modeling Three-Dimensional Structural Motifs of Viral IRES. *J Mol Biol* 428, 767-776.
- Lozano, G., and Martinez-Salas, E. (2015). Structural insights into viral IRES-dependent translation mechanisms. *Curr Opin Virol* 12, 113-120.
- Lunde, B. M., Moore, C., and Varani, G. (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 479-490.
- Luz, N., and Beck, E. (1991). Interaction of a cellular 57-kilodalton protein with the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 65, 6486-6494.
- Lyabin, D. N., Eliseeva, I. A., and Ovchinnikov, L. P. (2014). YB-1 protein: functions and regulation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 5, 95-110.
- Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y. F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2001). Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* 291, 316-319.
- Maere, S., Heymans, K., and Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* 21, 3448-3449.
- Majzoub, K., Hafirassou, M. L., Meignin, C., Goto, A., Marzi, S., Fedorova, A., Verdier, Y., Vinh, J., Hoffmann, J. A., Martin, F., et al. (2014). RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses. *Cell* 159, 1086-1095.
- Makeyev, A. V., and Liebhaber, S. A. (2002). The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA* 8, 265-278.
- Markus, M. A., Hinck, A. P., Huang, S., Draper, D. E., and Torchia, D. A. (1997). High resolution solution structure of ribosomal protein L11-C76, a helical protein with a flexible loop that becomes structured upon binding to RNA. *Nat Struct Biol* 4, 70-77.
- Martin-Acebes, M. A., Gonzalez-Magaldi, M., Rosas, M. F., Borrego, B., Brocchi, E., Armas-Portela, R., and Sobrino, F. (2008). Subcellular distribution of swine vesicular disease virus proteins and alterations induced in infected cells: a comparative study with foot-and-mouth disease virus and vesicular stomatitis virus. *Virology* 374, 432-443.

BIBLIOGRAFÍA

- Martinez-salas, E., and Belsham, G. J. (2017). Genome Organization, Translation and Replication of Foot-and-mouth disease Virus RNA. In *Foot-and-mouth Disease Virus*, F. Sobrino, and Domingo, E., ed. (Madrid: Caister Academic Press), pp. 13-42.
- Martinez-Salas, E., Francisco-Velilla, R., Fernandez-Chamorro, J., Lozano, G., and Diaz-Toledano, R. (2015). Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions. *Virus Res* 206, 62-73.
- Martinez-Salas, E., Saiz, J. C., Davila, M., Belsham, G. J., and Domingo, E. (1993). A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo. *J Virol* 67, 3748-3755.
- Mason, P. W., Bezborodova, S. V., and Henry, T. M. (2002). Identification and characterization of a cis-acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 76, 9686-9694.
- Melero, R., Buchwald, G., Castano, R., Raabe, M., Gil, D., Lazaro, M., Urlaub, H., Conti, E., and Llorca, O. (2012). The cryo-EM structure of the UPF-EJC complex shows UPF1 poised toward the RNA 3' end. *Nat Struct Mol Biol* 19, 498-505, S491-492.
- Mendell, J. T., ap Rhys, C. M., and Dietz, H. C. (2002). Separable roles for rent1/hUpf1 in altered splicing and decay of nonsense transcripts. *Science* 298, 419-422.
- Mi, H., Huang, X., Muruganujan, A., Tang, H., Mills, C., Kang, D., and Thomas, P. D. (2017). PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res* 45, D183-D189.
- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J. T., and Thomas, P. D. (2013). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat Protoc* 8, 1551-1566.
- Midgley, R., Moffat, K., Berryman, S., Hawes, P., Simpson, J., Fullen, D., Stephens, D. J., Burman, A., and Jackson, T. (2013). A role for endoplasmic reticulum exit sites in foot-and-mouth disease virus infection. *J Gen Virol* 94, 2636-2646.
- Mili, S., and Pinol-Roma, S. (2003). LRP130, a pentatricopeptide motif protein with a noncanonical RNA-binding domain, is bound in vivo to mitochondrial and nuclear RNAs. *Mol Cell Biol* 23, 4972-4982.
- Miller, S., and Krijnse-Locker, J. (2008). Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* 6, 363-374.
- Monetta, P., Slavin, I., Romero, N., and Alvarez, C. (2007). Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association. *Mol Biol Cell* 18, 2400-2410.
- Moore, M. J. (2005). From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309, 1514-1518.
- Mourelatos, Z., Abel, L., Yong, J., Kataoka, N., and Dreyfuss, G. (2001). SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. *EMBO J* 20, 5443-5452.
- Muller-McNicoll, M., and Neugebauer, K. M. (2013). How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes. *Nat Rev Genet* 14, 275-287.
- Nayak, A., Goodfellow, I. G., and Belsham, G. J. (2005). Factors required for the Uridylylation of the foot-and-mouth disease virus 3B1, 3B2, and 3B3 peptides by the RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) in vitro. *J Virol* 79, 7698-7706.
- Nicastro, G., Taylor, I. A., and Ramos, A. (2015). KH-RNA interactions: back in the groove. *Curr Opin Struct Biol* 30, 63-70.
- Nilsen, T. W. (2003). The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays* 25, 1147-1149.
- Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J., and Nissen, P. (2004). Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep* 5, 1137-1141.

- Nishiyama, T., Yamamoto, H., Uchiyumi, T., and Nakashima, N. (2007). Eukaryotic ribosomal protein RPS25 interacts with the conserved loop region in a dicistroviral intergenic internal ribosome entry site. *Nucleic Acids Res* 35, 1514-1521.
- Nufer, O., Guldbrandsen, S., Degen, M., Kappeler, F., Paccaud, J. P., Tani, K., and Hauri, H. P. (2002). Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export. *J Cell Sci* 115, 619-628.
- Oberstrass, F. C., Auweter, S. D., Erat, M., Hargous, Y., Henning, A., Wenter, P., Reymond, L., Amir-Ahmady, B., Pitsch, S., Black, D. L., and Allain, F. H. (2005). Structure of PTB bound to RNA: specific binding and implications for splicing regulation. *Science* 309, 2054-2057.
- Olsen, J. V., Ong, S. E., and Mann, M. (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics* 3, 608-614.
- Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1, 376-386.
- Otter, S., Grimmmler, M., Neuenkirchen, N., Chari, A., Sickmann, A., and Fischer, U. (2007). A comprehensive interaction map of the human survival of motor neuron (SMN) complex. *J Biol Chem* 282, 5825-5833.
- Pacheco, A., Lopez de Quinto, S., Ramajo, J., Fernandez, N., and Martinez-Salas, E. (2009). A novel role for Gemin5 in mRNA translation. *Nucleic Acids Res* 37, 582-590.
- Pacheco, A., and Martinez-Salas, E. (2010). Insights into the biology of IRES elements through riboproteomic approaches. *J Biomed Biotechnol* 2010, 458927.
- Pacheco, A., Reigadas, S., and Martinez-Salas, E. (2008). Riboproteomic analysis of polypeptides interacting with the internal ribosome-entry site element of foot-and-mouth disease viral RNA. *Proteomics* 8, 4782-4790.
- Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 867.
- Panyasrivani, M., Khakpoor, A., Wikan, N., and Smith, D. R. (2009). Co-localization of constituents of the dengue virus translation and replication machinery with amphisomes. *J Gen Virol* 90, 448-456.
- Park, H. H. (2013). Structural basis of membrane trafficking by Rab family small G protein. *Int J Mol Sci* 14, 8912-8923.
- Park, S. M., Paek, K. Y., Hong, K. Y., Jang, C. J., Cho, S., Park, J. H., Kim, J. H., Jan, E., and Jang, S. K. (2011). Translation-competent 48S complex formation on HCV IRES requires the RNA-binding protein NSAP1. *Nucleic Acids Res* 39, 7791-7802.
- Parry, D. A. (1982). Coiled-coils in alpha-helix-containing proteins: analysis of the residue types within the heptad repeat and the use of these data in the prediction of coiled-coils in other proteins. *Biosci Rep* 2, 1017-1024.
- Passmore, L. A., Schmeing, T. M., Maag, D., Applefield, D. J., Acker, M. G., Algire, M. A., Lorsch, J. R., and Ramakrishnan, V. (2007). The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Mol Cell* 26, 41-50.
- Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320-325.
- Pestova, T. V., and Hellen, C. U. (2000). The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* 57, 651-674.
- Pestova, T. V., Hellen, C. U., and Shatsky, I. N. (1996). Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol Cell Biol* 16, 6859-6869.
- Pestova, T. V., and Kolupaeva, V. G. (2002). The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* 16, 2906-2922.

BIBLIOGRAFÍA

- Pestova, T. V., Lomakin, I. B., Lee, J. H., Choi, S. K., Dever, T. E., and Hellen, C. U. (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403, 332-335.
- Pestova, T. V., Shatsky, I. N., Fletcher, S. P., Jackson, R. J., and Hellen, C. U. (1998). A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* 12, 67-83.
- Pfingsten, J. S., Costantino, D. A., and Kieft, J. S. (2006). Structural basis for ribosome recruitment and manipulation by a viral IRES RNA. *Science* 314, 1450-1454.
- Pilipenko, E. V., Pestova, T. V., Kolupaeva, V. G., Khitrina, E. V., Poperechnaya, A. N., Agol, V. I., and Hellen, C. U. (2000). A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes Dev* 14, 2028-2045.
- Pineiro, D., Fernandez-Chamorro, J., Francisco-Velilla, R., and Martinez-Salas, E. (2015). Gemin5: A Multitasking RNA-Binding Protein Involved in Translation Control. *Biomolecules* 5, 528-544.
- Pineiro, D., Fernandez, N., Ramajo, J., and Martinez-Salas, E. (2013). Gemin5 promotes IRES interaction and translation control through its C-terminal region. *Nucleic Acids Res* 41, 1017-1028.
- Pineiro, D., Ramajo, J., Bradrick, S. S., and Martinez-Salas, E. (2012). Gemin5 proteolysis reveals a novel motif to identify L protease targets. *Nucleic Acids Res* 40, 4942-4953.
- Pisarev, A. V., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2007). Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* 131, 286-299.
- Pisarev, A. V., Skabkin, M. A., Pisareva, V. P., Skabkina, O. V., Rakotondrafara, A. M., Hentze, M. W., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2010). The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol Cell* 37, 196-210.
- Pisareva, V. P., Pisarev, A. V., Komar, A. A., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2008). Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DEXH-box protein DHX29. *Cell* 135, 1237-1250.
- Plutner, H., Cox, A. D., Pind, S., Khosravi-Far, R., Bourne, J. R., Schwaninger, R., Der, C. J., and Balch, W. E. (1991). Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments. *J Cell Biol* 115, 31-43.
- Ponchon, L., Beauvais, G., Nonin-Lecomte, S., and Dardel, F. (2009). A generic protocol for the expression and purification of recombinant RNA in *Escherichia coli* using a tRNA scaffold. *Nat Protoc* 4, 947-959.
- Qin, X., and Sarnow, P. (2004). Preferential translation of internal ribosome entry site-containing mRNAs during the mitotic cycle in mammalian cells. *J Biol Chem* 279, 13721-13728.
- Ramos-Fernandez, A., Paradela, A., Navajas, R., and Albar, J. P. (2008). Generalized method for probability-based peptide and protein identification from tandem mass spectrometry data and sequence database searching. *Mol Cell Proteomics* 7, 1748-1754.
- Ramos, A., Grunert, S., Adams, J., Micklem, D. R., Proctor, M. R., Freund, S., Bycroft, M., St Johnston, D., and Varani, G. (2000). RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. *EMBO J* 19, 997-1009.
- Ramos, R., and Martinez-Salas, E. (1999). Long-range RNA interactions between structural domains of the aphthovirus internal ribosome entry site (IRES). *RNA* 5, 1374-1383.
- Reid, D. W., and Nicchitta, C. V. (2015). Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 221-231.
- Ricci, E. P., Kucukural, A., Cenik, C., Mercier, B. C., Singh, G., Heyer, E. E., Ashar-Patel, A., Peng, L., and Moore, M. J. (2014). Staufen1 senses overall transcript secondary structure to regulate translation. *Nat Struct Mol Biol* 21, 26-35.
- Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E. C., Brown, C. J., and Dunker, A. K. (2001). Sequence complexity of disordered protein. *Proteins* 42, 38-48.

- Ron, D., and Harding, H.P. (2007). eIF2a phosphorylation in cellular stress responses and disease. In *Translational Control in Biology and Medicine*, N.S. Michael B. Mathews, John W.B. Hershey, ed. (NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 345-368.
- Rosner, A., and Rinkevich, B. (2007). The DDX3 subfamily of the DEAD box helicases: divergent roles as unveiled by studying different organisms and in vitro assays. *Curr Med Chem* 14, 2517-2525.
- Ross, P. L., Huang, Y. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., et al. (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3, 1154-1169.
- Scherrer, T., Mittal, N., Janga, S. C., and Gerber, A. P. (2010). A screen for RNA-binding proteins in yeast indicates dual functions for many enzymes. *PLoS One* 5, e15499.
- Schroder-Kohne, S., Letourneur, F., and Riezman, H. (1998). Alpha-COP can discriminate between distinct, functional di-lysine signals in vitro and regulates access into retrograde transport. *J Cell Sci* 111 (Pt 23), 3459-3470.
- Schuler, M., Connell, S. R., Lescoute, A., Giesebrecht, J., Dabrowski, M., Schroeder, B., Mielke, T., Penczek, P. A., Westhof, E., and Spahn, C. M. (2006). Structure of the ribosome-bound cricket paralysis virus IRES RNA. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1092-1096.
- Schutz, P., Bumann, M., Oberholzer, A. E., Bieniossek, C., Trachsel, H., Altmann, M., and Baumann, U. (2008). Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: an RNA-helicase controlled by protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9564-9569.
- Searles, M. A., Lu, D., and Klug, A. (2000). The role of the central zinc fingers of transcription factor IIIA in binding to 5 S RNA. *J Mol Biol* 301, 47-60.
- Semler, B. L., Dorner, A. J., and Wimmer, E. (1984). Production of infectious poliovirus from cloned cDNA is dramatically increased by SV40 transcription and replication signals. *Nucleic Acids Res* 12, 5123-5141.
- Serrano, P., Gomez, J., and Martinez-Salas, E. (2007). Characterization of a cyanobacterial RNase P ribozyme recognition motif in the IRES of foot-and-mouth disease virus reveals a unique structural element. *RNA* 13, 849-859.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13, 2498-2504.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.
- Shin, B. S., Maag, D., Roll-Mecak, A., Arefin, M. S., Burley, S. K., Lorsch, J. R., and Dever, T. E. (2002). Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity. *Cell* 111, 1015-1025.
- Shpargel, K. B., and Matera, A. G. (2005). Gemin proteins are required for efficient assembly of Sm-class ribonucleoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17372-17377.
- Shrivastava, S., Raychoudhuri, A., Steele, R., Ray, R., and Ray, R. B. (2011). Knockdown of autophagy enhances the innate immune response in hepatitis C virus-infected hepatocytes. *Hepatology* 53, 406-414.
- Slavin, I., Garcia, I. A., Monetta, P., Martinez, H., Romero, N., and Alvarez, C. (2011). Role of Rab1b in COPII dynamics and function. *Eur J Cell Biol* 90, 301-311.
- Sobrinho, F., and Domingo, E. (2001). Foot-and-mouth disease in Europe. FMD is economically the most important disease of farm animals. Its re-emergence in Europe is likely to have consequences that go beyond severe alterations of livestock production and trade. *EMBO Rep* 2, 459-461.

BIBLIOGRAFÍA

- Solomon, S., Xu, Y., Wang, B., David, M. D., Schubert, P., Kennedy, D., and Schrader, J. W. (2007). Distinct structural features of caprin-1 mediate its interaction with G3BP-1 and its induction of phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α , entry to cytoplasmic stress granules, and selective interaction with a subset of mRNAs. *Mol Cell Biol* 27, 2324-2342.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A. G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731-745.
- Stoneley, M., Paulin, F. E., Le Quesne, J. P., Chappell, S. A., and Willis, A. E. (1998). C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene* 16, 423-428.
- Strebel, K., and Beck, E. (1986). A second protease of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 58, 893-899.
- Suganuma, T., Pattenden, S. G., and Workman, J. L. (2008). Diverse functions of WD40 repeat proteins in histone recognition. *Genes Dev* 22, 1265-1268.
- Sun, C., Todorovic, A., Querol-Audi, J., Bai, Y., Villa, N., Snyder, M., Ashchyan, J., Lewis, C. S., Hartland, A., Gradia, S., et al. (2011). Functional reconstitution of human eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3). *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20473-20478.
- Tagwerker, C., Flick, K., Cui, M., Guerrero, C., Dou, Y., Auer, B., Baldi, P., Huang, L., and Kaiser, P. (2006). A tandem affinity tag for two-step purification under fully denaturing conditions: application in ubiquitin profiling and protein complex identification combined with in vivocross-linking. *Mol Cell Proteomics* 5, 737-748.
- Thandapani, P., O'Connor, T. R., Bailey, T. L., and Richard, S. (2013). Defining the RGG/RG motif. *Mol Cell* 50, 613-623.
- Timchenko, N. A., Welm, A. L., Lu, X., and Timchenko, L. T. (1999). CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBP β mRNA and regulates translation of C/EBP β isoforms. *Nucleic Acids Res* 27, 4517-4525.
- Tisdale, E. J., Bourne, J. R., Khosravi-Far, R., Der, C. J., and Balch, W. E. (1992). GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J Cell Biol* 119, 749-761.
- Tsai, B. P., Wang, X., Huang, L., and Waterman, M. L. (2011). Quantitative profiling of in vivo-assembled RNA-protein complexes using a novel integrated proteomic approach. *Mol Cell Proteomics* 10, M110 007385.
- Walsh, D., and Mohr, I. (2011). Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat Rev Microbiol* 9, 860-875.
- Walter, B. L., Nguyen, J. H., Ehrenfeld, E., and Semler, B. L. (1999). Differential utilization of poly(rC) binding protein 2 in translation directed by picornavirus IRES elements. *RNA* 5, 1570-1585.
- Wang, X., and Huang, L. (2008). Identifying dynamic interactors of protein complexes by quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 7, 46-57.
- Wang, X., Zhao, B. S., Roundtree, I. A., Lu, Z., Han, D., Ma, H., Weng, X., Chen, K., Shi, H., and He, C. (2015). N(6)-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell* 161, 1388-1399.
- Weiss, M. A., Ellenberger, T., Wobbe, C. R., Lee, J. P., Harrison, S. C., and Struhl, K. (1990). Folding transition in the DNA-binding domain of GCN4 on specific binding to DNA. *Nature* 347, 575-578.
- Whitton, J. L., Cornell, C. T., and Feuer, R. (2005). Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat Rev Microbiol* 3, 765-776.
- Wilde, I. B., Brack, M., Winget, J. M., and Mayor, T. (2011). Proteomic characterization of aggregating proteins after the inhibition of the ubiquitin proteasome system. *J Proteome Res* 10, 1062-1072.
- Wilkie, G. S., Dickson, K. S., and Gray, N. K. (2003). Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci* 28, 182-188.

- Woeller, C. F., Gaspari, M., Isken, O., and Maquat, L. E. (2008). NMD resulting from encephalomyocarditis virus IRES-directed translation initiation seems to be restricted to CBP80/20-bound mRNA. *EMBO Rep* 9, 446-451.
- Workman, E., Kalda, C., Patel, A., and Battle, D. J. (2015). Gemin5 Binds to the Survival Motor Neuron mRNA to Regulate SMN Expression. *J Biol Chem* 290, 15662-15669.
- Xiang, S., Gapsys, V., Kim, H. Y., Bessonov, S., Hsiao, H. H., Mohlmann, S., Klaukien, V., Ficner, R., Becker, S., Urlaub, H., et al. (2013). Phosphorylation drives a dynamic switch in serine/arginine-rich proteins. *Structure* 21, 2162-2174.
- Xu, C., Ishikawa, H., Izumikawa, K., Li, L., He, H., Nobe, Y., Yamauchi, Y., Shahjee, H. M., Wu, X. H., Yu, Y. T., et al. (2016). Structural insights into Gemin5-guided selection of pre-snRNAs for snRNP assembly. *Genes Dev* 30, 2376-2390.
- Yamashita, A., Izumi, N., Kashima, I., Ohnishi, T., Saari, B., Katsuhata, Y., Muramatsu, R., Morita, T., Iwamatsu, A., Hachiya, T., et al. (2009). SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 23, 1091-1105.
- Yamashita, A., Ohnishi, T., Kashima, I., Taya, Y., and Ohno, S. (2001). Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 15, 2215-2228.
- Yamayoshi, S., Neumann, G., and Kawaoka, Y. (2010). Role of the GTPase Rab1b in ebolavirus particle formation. *J Virol* 84, 4816-4820.
- Yang, R., Gaidamakov, S. A., Xie, J., Lee, J., Martino, L., Kozlov, G., Crawford, A. K., Russo, A. N., Conte, M. R., Gehring, K., and Maraia, R. J. (2011). La-related protein 4 binds poly(A), interacts with the poly(A)-binding protein MLLE domain via a variant PAM2w motif, and can promote mRNA stability. *Mol Cell Biol* 31, 542-556.
- Yang, W., Hood, B. L., Chadwick, S. L., Liu, S., Watkins, S. C., Luo, G., Conrads, T. P., and Wang, T. (2008). Fatty acid synthase is up-regulated during hepatitis C virus infection and regulates hepatitis C virus entry and production. *Hepatology* 48, 1396-1403.
- Yong, J., Kasim, M., Bachorik, J. L., Wan, L., and Dreyfuss, G. (2010). Gemin5 delivers snRNA precursors to the SMN complex for snRNP biogenesis. *Mol Cell* 38, 551-562.
- Yu, T. X., Rao, J. N., Zou, T., Liu, L., Xiao, L., Ouyang, M., Cao, S., Gorospe, M., and Wang, J. Y. (2013). Competitive binding of CUGBP1 and HuR to occludin mRNA controls its translation and modulates epithelial barrier function. *Mol Biol Cell* 24, 85-99.
- Zenner, H. L., Yoshimura, S., Barr, F. A., and Crump, C. M. (2011). Analysis of Rab GTPase-activating proteins indicates that Rab1a/b and Rab43 are important for herpes simplex virus 1 secondary envelopment. *J Virol* 85, 8012-8021.
- Zhang, C., and Zhang, F. (2015). The Multifunctions of WD40 Proteins in Genome Integrity and Cell Cycle Progression. *J Genomics* 3, 40-50.
- Zhao, X., Lasell, T. K., and Melancon, P. (2002). Localization of large ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factors to different Golgi compartments: evidence for distinct functions in protein traffic. *Mol Biol Cell* 13, 119-133.

